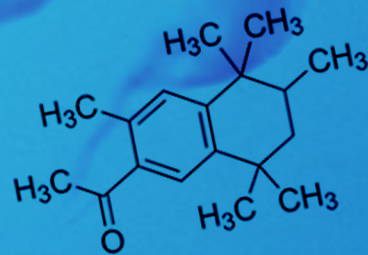
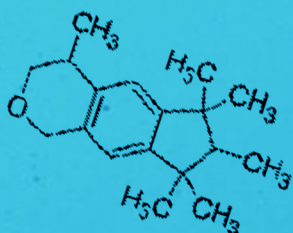
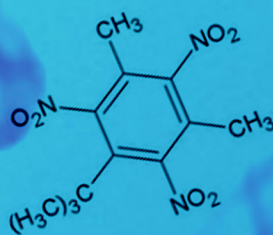
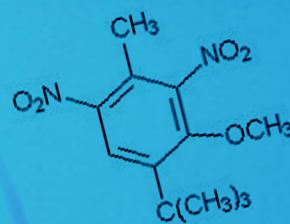
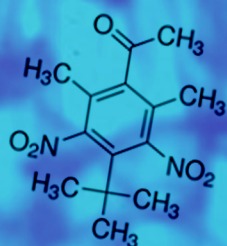


ANÁLISIS DE FRAGANCIAS EN AGUAS MEDIANTE TÉCNICAS AVANZADAS DE CROMATOGRAFÍA



TESIS DOCTORAL

INMACULADA SEIJO DELGADO
LICENCIADA EN CIENCIAS QUÍMICAS
SEVILLA, 2016





DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA
"PROFESOR F. PINO PÉREZ"
FACULTAD DE QUÍMICA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

ANÁLISIS DE FRAGANCIAS EN AGUAS MEDIANTE TÉCNICAS AVANZADAS DE CROMATOGRAFÍA

TESIS DOCTORAL

Inmaculada Seijo Delgado
Licenciada en Ciencias Químicas
Abril, 2016



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

**ANÁLISIS DE FRAGANCIAS EN AGUAS
MEDIANTE TÉCNICAS AVANZADAS DE
CROMATOGRFÍA**

Trabajo que presenta la Licenciada en Ciencias Químicas Inmaculada Seijo Delgado, para optar al Grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Sevilla

Sevilla, 22 de Abril de 2016

Fdo. Inmaculada Seijo Delgado.



**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA
"PROFESOR F. PINO PÉREZ"
FACULTAD DE QUÍMICA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

Este Trabajo ha sido realizado en el Departamento de Química Analítica "Francisco Pino Pérez" de la Universidad de Sevilla, bajo la dirección de D. Miguel Ternero Rodríguez y del Asistente honorario D. Ramón Bouza Deaño.

Los Directores, por la presente, autorizan su presentación.

En Sevilla, a 22 de abril de dos mil dieciséis.

Fdo. D. Miguel Ternero Rodríguez
Catedrático de Universidad

Fdo. D. Ramón Bouza Deaño
Asistente honorario



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA
"PROFESOR F. PINO PÉREZ"
FACULTAD DE QUÍMICA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

D. Agustín García Asuero, Catedrático de Universidad y Director del Departamento de Química Analítica "Francisco Pino Pérez" de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación "ANÁLISIS DE FRAGANCIAS EN AGUAS MEDIANTE TÉCNICAS AVANZADAS DE CROMATOGRFÍA" ha sido realizado en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Sevilla, bajo la dirección de D. Miguel Ternero Rodríguez y D. Ramón Bouza Deaño, y reúne las condiciones exigidas a los trabajos de tesis doctoral de la Universidad de Sevilla.

Y para que conste, expido y firmo el presente certificado en Sevilla, a 22 de abril de 2016.

Fdo. D. Agustín García Asuero

"Puedes conseguir en la vida todo lo que te propongas"

A MIS PADRES

AGRADECIMIENTOS

Quisiera mostrar mi más sincera gratitud a mis DIRECTORES, Miguel Ternero y Ramón Bouza, por su apoyo y dedicación. Por el gran trabajo y esfuerzo que realizan enseñándome, guiándome y corrigiéndome, siempre con buenas palabras y motivándome para seguir en todo momento. Miguel, eres para mí, un gran ejemplo de trabajo constante y superación diaria, de no rendirte nunca ante cualquier adversidad. Espero que además de tus valiosas enseñanzas como investigador, se me haya contagiado aunque sea un poco de tu espíritu de lucha. También quería agradecerle su disposición, entrega y sobreesfuerzo realizado para que esta tesis llegara a buen puerto, confiando en mí en todo momento. A Ramón, quería agradecerle su punto de vista laboral y profesional, en técnicas de laboratorio, valoración de datos y resultados, por compartir conmigo su gran experiencia profesional.

Quisiera demostrar mi más sincero agradecimiento a la fundación CENTA, en especial a Juan José Salas, por su gran disponibilidad, apoyo y ayuda, facilitándome y acompañándome a la toma de muestras en sus instalaciones.

Igualmente quisiera demostrar mi más sincero agradecimiento al personal de la EDAR el COPERO, José Antonio González Carballo, Fernando Estéves, Enrique Toro, Elvira Reina, Natividad Fernández y demás operarios de planta, que me han atendido con mucha amabilidad y disponibilidad en todo momento.

Al Centro de Investigación Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla, CITIUS, por brindarme la oportunidad de desarrollar esta tesis doctoral en sus instalaciones, me gustaría darles las gracias a Julián Martínez, Patricia Aparicio, Miguel Ángel Bello y por supuesto a Alfonso Guiraum, por darme la oportunidad de pertenecer al Servicio de Microanálisis.

Como no, al Servicio de Microanálisis agradecerle la disponibilidad y facilidades en todo lo que he necesitado, tanto instrumental, como de ánimo y apoyo moral de mis compañeras Chari Toledano, Laura Vidal y María Jesús Romero. A Chari, también agradecerle su tiempo de dedicación, peleándose conmigo en la puesta a punto del equipo, por sus conocimientos y razonamientos científicos, por sus compañía y ayuda en esas tardes de desesperación y agobio.

Al Departamento de Química Analítica, de la Facultad de Químicas de la Universidad de Sevilla, por brindarme la oportunidad de realizar esta tesis doctoral, y a todos los compañeros que lo constituyen, en especial a su Director Agustín García Asuero, por darme la oportunidad sin conocerme de trabajar en la Confederación Hidrográfica del Guadalquivir en 2006, y por apoyarme incondicionalmente en todo lo que he necesitado en todos estos años. A Marcos Jurado, por ser muy buen compañero y ayudarme en la impartición de docencia. A Joaquín y Gustavo, por atender mis necesidades instrumentales. A Sofía por su ayuda en la tramitación de documentación y su ofrecimiento sincero en todo lo que he necesitado.

A mis compañeros del grupo de investigación Química Analítica Ambiental: Francisco Gutiérrez, Antonio José Fernández, Rocío Montoya y Victoria Fernández, por los buenos ratos pasados en el laboratorio.

A Juan Carlos, personal de la biblioteca, por su amistad y ayuda en la obtención de normas y artículos científicos.

A mi familia por su apoyo incondicional, por confiar ciegamente en mí, por transmitirme la seguridad de que puedo conseguir todo lo que me proponga, por su empuje en mis momentos de desanimo y porque son los pilares que sustentan mi vida. A mi hermano, por la toma de muestras en la playa y por colaborar conmigo en todo lo que he necesitado.

A mi David, por ser mi compañero de muestreo y de vida, por no dejarme sola nunca, por aguantar mis momentos de agobio y nervios a lo largo de esta tesis, por ser mi apoyo informático y diseñarme la portada de este trabajo.

OBJETO Y CONTENIDO DE LA TESIS DOCTORAL

El trabajo de investigación que se recoge en esta Tesis Doctoral se encuadra en el contexto de las líneas de investigación que viene desarrollando el Grupo de Investigación “Química Analítica Ambiental” del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Sevilla desde hace más de veinticinco años. Estas investigaciones se han centrado tanto en el desarrollo y validación de metodologías para el control analítico de la contaminación ambiental como en su aplicación para la resolución de problemas ambientales en los distintos ecosistemas: aguas (superficiales, subterráneas, pluviales, residuales, minerales naturales envasadas), atmósfera (partículas sedimentables y en suspensión, polen, gases), suelos y sedimentos acuáticos, residuos (lodos de depuradora, residuos industriales, etc.).

El medio acuático es por tanto uno de estos sistemas medioambientales en los que el Grupo de Investigación ha desarrollado diversas metodologías para la determinación de contaminantes y para el tratamiento quimiométrico de series de datos y análisis de tendencias. Por otra parte, ha llevado a cabo estudios de diversos sistemas hídricos y acuíferos del sur de España así como de procesos de depuración tanto mediante tecnologías convencionales como con nuevas tecnologías extensivas.

El trabajo de investigación que se desarrolla en esta Tesis Doctoral supone el inicio de una nueva línea de investigación en el campo de los contaminantes emergentes en aguas. El control analítico de estos contaminantes supone hoy en día un nuevo reto y problemática a los que hay que aportar soluciones a través del desarrollo de metodologías apropiadas para alcanzar los bajos niveles de concentración en los que se encuentran en el medio acuático.

Dentro del amplio abanico de sustancias químicas que se catalogan como contaminantes emergentes, los compuestos que forman parte de las

fragancias son sustancias que hay que medir en el medio acuático por su potencial peligrosidad y por ello es necesario desarrollar, optimizar y validar las metodologías analíticas para su cuantificación en distintas matrices. Con ello se podrán generar nuevos datos analíticos sobre la presencia de los mismos que permitirán no sólo conocer la situación actual sino también la evolución en el tiempo de la presencia de estos contaminantes en nuestras aguas.

Por estas razones, los objetivos generales del trabajo que se desarrolla en esta Tesis Doctoral tienen un indudable interés, tanto teórico como práctico. Desde el primero de ellos, por el desarrollo, optimización y validación de una metodología apropiada para alcanzar los bajos niveles, ng/L, en que se encuentran. Para ello se utilizarán técnicas avanzadas de cromatografía que permitirán, no sólo su detección e identificación, sino también su cuantificación a nivel traza o ultratrazas.

Por otro lado, desde el punto de vista práctico, por su aplicación al estudio de aguas naturales y al estudio de la eficacia para este tipo de compuestos de los procesos de depuración de aguas residuales. Las aguas residuales urbanas depuradas, tras su paso por las plantas de depuración de aguas residuales, son liberadas a otros medios hídricos, tales como ríos o mares, actuando éstos como medios receptores de estos contaminantes en caso de no ser eliminados en las depuradoras. La presencia de estos compuestos en los efluentes depurados pueden dificultar la reutilización de las mismas para diversos usos como riego, industria, recarga de acuíferos, etc.

Dentro de los objetivos generales descritos en apartados anteriores, de manera específica el estudio propuesto se abordará desde la perspectiva de un triple objetivo.

1. Desarrollar y optimizar un método analítico adecuado para la determinación de los principales compuestos constituyentes de las fragancias en aguas. Para ello se estudiarán y optimizarán las fases de:

- a. Extracción de los analitos mediante técnicas de separación apropiadas
 - b. Detección y cuantificación de los analitos mediante técnicas avanzadas de cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas.
2. Validar la metodología analítica en lo referente a:
- a. Parámetros indicadores de la separación cromatográfica (tiempo de retención, factor de capacidad, factor de selectividad, factor de resolución y eficacia de la separación).
 - b. Parámetros indicadores de la determinación analítica (selectividad, especificidad, linealidad, rango de trabajo, veracidad, exactitud, precisión, límites de detección y cuantificación, robustez e incertidumbre).
3. Implementar la metodología analítica como método de rutina y evaluar su aplicabilidad en distintos tipos de muestras de agua para obtener datos de concentración de los distintos componentes de las fragancias:
- a. Aguas de río, en particular los ríos Guadalquivir y uno de sus afluentes, el río Guadaíra.
 - b. Aguas de mar tomadas en la costa atlántica de Huelva.
 - c. Aguas residuales urbanas en las distintas etapas de los procesos de depuración tanto con tecnologías convencionales como con tecnologías avanzadas. Con ello se pretende finalmente evaluar la eficiencia de eliminación de estos compuestos con objeto de obtener datos sobre qué sistemas pueden ser los más adecuados a la hora de su eliminación.

La presente Memoria de Tesis Doctoral recoge el trabajo de investigación realizado para el cumplimiento de estos objetivos y consta de cinco capítulos:

- I. Introducción y antecedentes bibliográficos
- II. Métodos experimentales

III. Optimización y puesta a punto

IV. Validación

V. Aplicación de la metodología analítica a muestras reales

En un primer capítulo de introducción, se describen previamente la contaminación de las aguas, los problemas que conllevan, los parámetros de calidad de las aguas y los contaminantes emergentes en los cuales, se van a caracterizar las fragancias, objeto de estudio de esta Tesis. Se realiza a continuación un estudio de la bibliografía sobre trabajos de investigación publicados y realizados con miras a la evaluación del impacto medioambiental, tanto acuático como terrestre, además del impacto en la salud de animales y personas. También se revisan los estudios realizados en procesos de depuración de aguas residuales urbanas. Concluyendo con el estudio de la metodología analítica aplicada por otros autores para contaminantes emergentes. Finalmente, se realiza una revisión de la legislación vigente tanto para los compuestos presentes en las fragancias como para la calidad de las aguas.

El capítulo segundo detalla los distintos métodos experimentales empleados en el presente trabajo de investigación. Se realiza en primer lugar una descripción de la toma y preparación de las muestras. A continuación se describen los métodos empleados para la extracción de los compuestos y su posterior identificación, separación y detección mediante técnicas cromatográficas.

El capítulo tercero describe en primer lugar la elección y la optimización del procedimiento de extracción de fragancias (almizcles) en aguas. En segundo lugar, se describe la optimización de los parámetros de introducción de muestras, inyección y separación cromatográfica. Finalizando, con el desarrollo de la identificación de los almizcles y puesta a punto del método en el detector de espectrometría de masas.

El capítulo cuarto describe la validación de la metodología analítica propuesta, comenzando con los parámetros de calidad de la separación cromatográfica y continuando con los parámetros de calidad de la determinación analítica, finalizando, con el estudio de la robustez y el cálculo de la incertidumbre del método analítico.

El capítulo cinco describe en primer lugar, los resultados obtenidos en las muestras tomadas durante un año de las aguas de río, mar y aguas residuales urbanas. En segundo lugar, se estudia la eficacia de eliminación de estos compuestos en diferentes procesos de depuración de aguas residuales urbanas. En tercer lugar, se realiza un estudio comparativo con los niveles encontrados en otros estudios y países. Finalmente, se describen de manera cualitativa otros compuestos catalogados como contaminantes emergentes y que se detectaron en el estudio realizado. Estos compuestos podrían ser determinados mediante esta metodología tras los procesos de optimización y validación correspondientes.

Por último, en la memoria se exponen las conclusiones obtenidas en el trabajo de investigación y se recogen las referencias bibliográficas citadas en el presente trabajo.

INDICE

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1. Contaminación de las aguas	9
1.1. Introducción	9
1.2. Problemática de la contaminación de las aguas	10
1.3. Contaminantes del agua	10
1.4. Parámetros analíticos indicadores de la calidad de las aguas	12
1.4.1. Parámetros físicos	12
1.4.2. Parámetros químicos	14
1.4.2.1. Inorgánicos	14
1.4.2.2. Orgánicos	16
1.4.2.3. Test de toxicidad	19
1.4.3. Parámetros microbiológicos	20
1.5. Contaminantes emergentes	22
2. Propiedades, uso y clasificación de los almizcles	26
2.1. Introducción	26
2.2. Consumo de almizcles	26
2.3. Clasificación de los almizcles	29
2.4. Principales almizcles	31
2.4.1. Tonalide	31
2.4.2. Galaxolide	32
2.4.3. Almizcles Ambreta	33
2.4.4. Almizcles Cetona	34
2.4.5. Almizcles Xileno	35
3. Efectos y niveles de fragancias en aguas	37
3.1. Efecto de las fragancias sobre la salud	37
3.2. Relación entre estudios de animales y personas	40
3.3. Efecto de las fragancias sobre el medioambiente acuático	41
3.4. Efecto de las fragancias sobre plantas y animales terrestres	47
3.5. Presencia de fragancias en la nieve y el aire	48
3.6. Toxicidad	49
3.7. Niveles de concentración encontrados en aguas	51
3.8. Fragancias en procesos de depuración de aguas residuales urbanas	53

3.8.1.	Tecnología de depuración de aguas residuales urbanas	53
3.8.1.1.	Tratamiento primario	54
3.8.1.2.	Tratamientos secundarios	55
3.8.1.3.	Tratamiento terciario con ozono	59
3.8.2.	Niveles de almizcles en EDAR	60
3.8.3.	Eliminación de almizcles en EDAR	61
4.	Metodología analítica para la determinación de fragancias en aguas	63
4.1.	Introducción	63
4.2.	Antecedentes bibliográficos sobre metodologías analíticas	64
4.3.	Extracción de los analitos	69
4.4.	Técnicas de determinación analítica	71
4.5.	Matrices estudiadas	72
4.5.1.	Aguas superficiales	72
4.5.2.	Agua de mar	72
4.5.3.	Aguas residuales urbanas	72
4.6.	Calidad en los análisis de laboratorio	74
5.	Normativa legal	76
5.1.	Producción y uso de almizcles	76
5.2.	Normativa sobre calidad de aguas	78

CAPÍTULO II: MÉTODOS EXPERIMENTALES

1.	Introducción	90
2.	Toma de muestras	90
2.1.	Introducción	90
2.2.	Equipo de toma de muestras	91
2.3.	Aguas superficiales	93
2.3.1.	Río Guadalquivir	95
2.3.2.	Río Guadaira	97
2.4.	Agua de mar	99
2.5.	Aguas residuales urbanas	101
2.5.2.	CENTA	101
2.5.1.	COPERO	104
3.	Preparación de muestras: Extracción de analitos	108
3.1.	Extracción Líquido-Líquido	108
3.1.1.	Extracción con tolueno.	108
3.1.2.	Extracción con n-hexano.	109

3.2.	Extracción en fase sólida (SPE)	109
3.3.	Microextracción en fase sólida (SPME)	110
4.	Equipo cromatográfico CG/MS/MS	113
4.1.	Instrumentación analítica: sistema cromatográfico	113
4.1.1.	Introducción	113
4.1.2.	El Cromatógrafo de gases	114
4.1.3.	Inyector automático	115
4.1.4.	Fuente de ionización	116
4.1.5.	Detector de masas/masas	118
4.2.	Identificación de los compuestos	119
4.3.	Modos de trabajo en el detector	122
4.4.	Cálculo de resultados	122
5.	Procedimiento para el análisis de fragancias en muestras de aguas	123
5.1.	Condiciones generales	123
5.2.	Pretratamiento de la muestra	123
5.3.	Parámetros del automuestreador	123
5.4.	Condiciones cromatográficas	124
5.5.	Condiciones del detector	124
6.	Materiales y reactivos utilizados	125
6.1.	Patrones y reactivos	125
6.1.1.	Patrones de referencia	125
6.1.2.	Reactivos, disolventes y gases	125
6.2.	Materiales e instrumentación	126
6.2.1.	Material	126
6.2.2.	Instrumentación auxiliar	128
7.	Métodos de Control de Calidad de Equipos	129
7.1.	Calibración de balanza analítica	129
7.2.	Calibración de micropipetas	130
7.3.	Calibración y mantenimiento CG/MS/MS	131

CAPITULO III: OPTIMIZACIÓN Y PUESTA A PUNTO

1.	Introducción	135
2.	Ensayos preliminares	136
2.1.	Evaluación de las extracciones Líquido-Líquido (LLE)	136

2.2.	Evaluación de la extracción en fase sólida (SPE)	138
2.3.	Evaluación de la microextracción en fase sólida (SPME)	139
2.4.	Comparación entre las diferentes métodos de extracción	142
3.	Optimización de la preparación de muestras mediante SPME	144
3.1.	Efecto de la adición de NaCl	144
3.2.	Volumen de muestra en el vial	147
3.3.	Tiempo de incubación	148
3.4.	Temperatura de incubación	149
3.5.	Tiempo de desorción de la fibra	150
3.6.	Efecto del pH	151
4.	Parámetros de introducción de muestra	152
4.1.	Inyección Líquida	152
4.2.	Inyección SPME	154
5.	Parámetros del inyector	156
5.1.	Inyección líquida	156
5.2.	Inyección líquida de grandes volúmenes (LVI)	157
5.3.	Inyección SPME	160
6.	Optimización de la determinación cromatográfica	161
6.1.	Elección de columnas y parámetros	161
6.2.	Desarrollo de la espectrometría de masas	167
6.2.1.	Introducción	167
6.2.2.	Full Scan	168
6.2.3.	SIM	177
6.2.4.	Product Scan	179
6.2.5.	MRM o MSMS	183
6.2.6.	SCAN TIME	185
6.3.	Detección	186
7.	Recopilación de los procedimientos de optimización realizados	187

CAPÍTULO IV. VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA

1.	<i>Introducción</i>	191
2.	<i>Parámetros de calidad de la separación cromatográfica</i>	194
2.1.	Parámetros de retención y factor de capacidad	194

2.2.	Parámetros de resolución	196
2.3.	Parámetros de eficacia	197
2.4.	Resumen y conclusiones de la validación de los parámetros de separación cromatográfica	198
3.	Parámetros de calidad de la determinación analítica	199
3.1.	Selectividad / especificidad	199
3.2.	Linealidad	203
3.3.	Exactitud	217
3.3.1.	Veracidad	217
3.3.2.	Precisión	221
3.3.2.1.	Repetitividad	222
3.3.2.2.	Reproducibilidad / Precisión intermedia	226
3.4.	Límites de detección y cuantificación	230
3.5.	Robustez	232
3.6.	Incertidumbre	236
3.6.1.	Introducción	236
3.6.2.	Cálculo de incertidumbre del método	237
3.7.	Resumen y conclusiones de la validación de los parámetros de calidad de la determinación analítica	241

CAPÍTULO V. APLICACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA A MUESTRAS REALES

1.	Introducción	245
2.	Resultados de pH y conductividad eléctrica	245
3.	Concentraciones de fragancias en muestras de agua de río	247
3.1.	Río Guadalquivir	247
3.2.	Río Guadaira	249
3.3.	Resumen de los resultados obtenidos en aguas de río	250
4.	Muestras de agua de mar	252
5.	Muestras de aguas residuales urbanas	253
5.1.	EDAR Copero	253
5.1.1.	Entrada Copero	253
5.1.2.	Salida del tratamiento primario de la EDAR Copero	254
5.1.3.	Salida del tratamiento secundario de la EDAR Copero	255
5.2.	EDAR CENTA	256

5.2.1.	Entrada CENTA _____	256
5.2.2.	Salida del tratamiento primero de la planta del CENTA _____	257
5.2.3.	Salida de tratamiento secundario de la planta del CENTA _____	257
5.3.	Resumen de resultados obtenidos con aguas residuales urbanas _____	258
5.4.	Eficacia de las EDARs para la eliminación de las fragancias _____	260
5.4.1.	Eficacia de la EDAR Copero _____	260
5.4.2.	Eficacia de la EDAR CENTA _____	261
6.	Estudio comparativo con otros trabajos de investigación _____	262
7.	Conclusiones de los resultados _____	264
8.	Otros contaminantes emergentes detectados / identificados en las muestras analizadas _____	265
 RESUMEN Y CONCLUSIONES _____		 288
 BIBLIOGRAFÍA _____		 295
 ACRÓNIMOS _____		 319
 ANEXO A _____		 323

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1. Contaminación de las aguas

1.1. Introducción

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el agua está contaminada cuando su composición se haya alterado de modo que no reúna las condiciones necesarias para ser utilizada beneficiosamente en el consumo del hombre y de los animales. En los cursos de agua, los microorganismos descomponedores mantienen siempre igual el nivel de concentración de las diferentes sustancias que puedan estar disueltas en el medio. Este proceso se denomina autodepuración del agua. Cuando la cantidad de contaminantes es excesiva, la autodepuración resulta imposible.

Dadas las propiedades físico-químicas del agua, esta se comporta como un magnífico disolvente tanto de compuestos orgánicos como inorgánicos, ya sean de naturaleza polar o apolar; de forma que podemos encontrarnos en su seno una gran cantidad de sustancias sólidas, líquidas y gaseosas diferentes que modifican sus propiedades. A su comportamiento como disolvente hay que añadir su capacidad para que se desarrolle vida en su seno, lo que la convierte en un sistema complejo sobre el que habrá que realizar análisis tanto cualitativos como cuantitativos con objeto de conocer el tipo y grado de alteración que ha sufrido, y consecuentemente como se encuentran modificadas sus propiedades para usos posteriores. Puesto que la alteración de la calidad del agua puede venir provocada tanto por efectos naturales como por la actuación humana derivada de la actividad industrial, agropecuaria, doméstica o de cualquier otra índole, no es de extrañar que el análisis de los parámetros de calidad del agua se deba realizar a todo tipo de aguas, independientemente de su origen.

1.2. Problemática de la contaminación de las aguas

La contaminación del agua representa un gran problema de Salud Pública (García, 2012). Los mecanismos de transmisión de las enfermedades pueden ser:

a) Directos. Por ingestión de agua contaminada, procedente de abastecimientos de grandes poblaciones o de pozos contaminados. En otros casos es por contacto cutáneo o mucoso (con fines recreativos, contacto laboral o incluso terapéutico) pudiendo originar infecciones locales en piel dañada o infecciones sistémicas en personas con problemas de inmunodepresión.

b) Indirectos. El agua actúa como vehículo de infecciones, o bien puede transmitirse a través de alimentos contaminados por el riego de aguas residuales. Así mismo, los moluscos acumulan gran cantidad de polivirus y pueden ser ingeridos y afectar a los seres humanos. Finalmente, algunos insectos que se reproducen en el agua son transmisores de enfermedades como el paludismo o la fiebre amarilla.

1.3. Contaminantes del agua

Los contaminantes del agua se pueden clasificar de diferentes maneras, una posibilidad es agruparlos en los siguientes ocho grupos:

- **Microorganismos patógenos:** son los diferentes tipos de microorganismos (bacterias, virus, protozoos y otros organismos microscópicos) que transmiten enfermedades como el cólera, tifus, gastroenteritis diversas, hepatitis, etc. En los países en vías de desarrollo las enfermedades producidas por estos patógenos son uno de los motivos más importantes de muerte prematura, sobre todo de niños. Normalmente estos microbios llegan al agua en las heces y otros restos orgánicos que producen las personas infectadas. Por esto, un buen indicador para medir la salubridad de las aguas, en lo que se refiere a estos microorganismos, es

el número de bacterias coliformes presentes en el agua. La OMS recomienda que en el agua para beber haya 0 colonias de coliformes por 100 ml de agua.

- **Desechos orgánicos biooxidables:** son el conjunto de residuos orgánicos producidos por los seres humanos, ganado, industria, etc. Incluyen heces y otros materiales que pueden ser descompuestos por bacterias aeróbicas, es decir, en procesos con consumo de oxígeno. Cuando este tipo de desechos se encuentran en exceso, la proliferación de bacterias agota el oxígeno, y ya no pueden vivir en estas aguas peces y otros seres vivos que necesitan oxígeno. Buenos indicadores para medir la contaminación por desechos orgánicos biooxidables son la cantidad de oxígeno disuelto, OD, en agua, o la DBO (Demanda bioquímica de oxígeno) y DQO (Demanda química de oxígeno).
- **Sustancias químicas inorgánicas:** en este grupo están incluidos ácidos, sales y metales tóxicos como el mercurio y el plomo. Si se encuentran en niveles por encima de la legislación vigente, pueden causar graves daños a los seres vivos, disminuir los rendimientos agrícolas y corroer los equipos que se usan para trabajar con el agua.
- **Nutrientes vegetales inorgánicos:** Nitratos y fosfatos son sustancias solubles en agua que las plantas necesitan para su desarrollo, pero si se encuentran en cantidad superiores a las recomendadas, inducen el crecimiento desmesurado de algas y otros organismos provocando la eutrofización de las aguas. Cuando estas algas y otros vegetales mueren, al ser descompuestos por los microorganismos, se agota el oxígeno y se hace imposible la vida de otros seres vivos. El resultado es un agua maloliente e inutilizable.
- **Compuestos orgánicos sintéticos (materia orgánica refractaria):** Muchas moléculas orgánicas como petróleo, gasolina, plásticos, plaguicidas, surfactantes, disolventes, detergentes, fragancias, etc. acaban en el agua y permanecen, en algunos casos, largos períodos de tiempo, al ser productos fabricados por el hombre, tienen estructuras moleculares complejas difíciles de degradar por los microorganismos. En este apartado

se incluirían los almizcles, que se encuentran en productos de higiene personal, productos de limpieza para el hogar, etc.

- **Sedimentos y materiales suspendidos:** Muchas partículas arrancadas del suelo y arrastradas a las aguas, junto con otros materiales que hay en suspensión en las aguas, son, en términos de masa total, la mayor fuente de contaminación del agua. La turbidez que provocan en el agua dificulta la vida de algunos organismos, y los sedimentos que se van acumulando destruyen sitios de alimentación o desove de los peces, rellenan lagos o pantanos y obstruyen canales, ríos y puertos.
- **Sustancias radiactivas:** Hay isótopos radiactivos solubles que pueden estar presentes en el agua y, a veces, se pueden ir acumulando a lo largo de las cadenas tróficas, alcanzando concentraciones considerablemente más altas en algunos tejidos vivos que las que tenían en el agua.
- **Contaminación térmica:** El agua caliente liberada por centrales de energía o procesos industriales eleva, en ocasiones, la temperatura de ríos o embalses con lo que disminuye su capacidad de contener oxígeno y afecta a la vida de los organismos

1.4. Parámetros analíticos indicadores de la calidad de las aguas

Los parámetros físicos, químicos y microbiológicos que son necesarios determinar para evaluar la contaminación de las aguas se detallan a continuación:

1.4.1. Parámetros físicos

Se relacionan a continuación los parámetros físicos más usuales:

- a) **Sólidos:** El agua puede contener tanto partículas en suspensión como compuestos solubilizados, definiéndose la suma de ambos como Sólidos Totales (ST). La determinación de ST se realiza, conforme a la norma UNE 77030:2015. Esta medida nos permite conocer el contenido total de sustancias no volátiles presentes en el agua. Además del contenido en sólidos totales, conviene conocer qué parte de estos sólidos se encuentra disuelta (SD) y qué

otra son sedimentable (Ss). Los Ss se determinan por decantación (UNE 77032:2015). Los Ss nos dan una idea de la cantidad de lodos que se producirán en la decantación primaria en los procesos de depuración de aguas. Los sólidos disueltos se determinan gravimétricamente mediante filtración y evaporación a sequedad del extracto líquidos (UNE-EN 872:2006). La pérdida de peso por ignición son los sólidos volátiles, siendo un indicador de la cantidad de materia orgánica presente en esa fracción de muestra. Los sólidos sedimentables son los causantes de la turbidez debido a que producen dispersión de la luz que atraviesa la muestra de agua. La determinación de turbidez se realiza conforme a la norma UNE-EN ISO 7027:2001 mediante métodos de observación semicuantitativos, indicando la profundidad a que deja de ser visible una marca u objeto patrón, o cuantitativos, empleando turbidímetros ópticos, dando los resultados en unidades nefelométricas de formacina (FNU).

b) Temperatura: La temperatura del agua tiene una gran importancia en el desarrollo de los diversos procesos que en ella se realizan, de forma que un aumento de la temperatura modifica la solubilidad de las sustancias, aumentando la de los sólidos disueltos y disminuyendo la de los gases. La temperatura se determina mediante termometría realizada “in situ”.

c) Color, olor y sabor: Son lo que se denomina propiedades organolépticas o determinables por los sentidos.

- Color (UNE-EN ISO 7887:2012): No existe una relación directa entre color y grado de contaminación, pues al tratarse de un parámetro fuertemente influido por interferencias con otras sustancias coloreadas, es difícil su evaluación absoluta.

- Olor (UNE-EN 1622:2007): Generalmente los olores son producidos por sustancias volátiles (COV's) o gaseosas (H_2S , NH_3 , etc.), y suelen ser debidos a materia orgánica en descomposición o productos químicos producidos o empleados en la industria y tratamiento de aguas residuales. El olor se determina por sucesivas diluciones de la muestra original con agua inodora ($T^a \approx 40\text{ }^\circ\text{C}$) hasta que es indetectable (umbral de percepción), siendo un ensayo muy subjetivo y de escasa reproducibilidad.

- Sabor (UNE-EN 1622:2007): Suele estar íntimamente asociado al olor (respuesta fisiológica parecida). Su determinación se efectúa, al igual que el olor, por dilución hasta determinar el umbral de percepción y sólo se realizará con muestras que sean sanitariamente aptas para consumo humano.

d) Conductividad (CE) (UNE-EN 27888:1994): El agua pura se comporta como aislante eléctrico, siendo las sustancias en ella disueltas las que proporcionan al agua la capacidad de conducir la corriente eléctrica. Se determina mediante potenciometría con un electrodo conductimétrico, expresándose el resultado en microsiemens cm^{-1} ($\mu\text{S} / \text{cm}$).

1.4.2. Parámetros químicos

1.4.2.1. Inorgánicos

Se comentan a continuación los parámetros que se determinan frecuentemente:

a) Acidez (pH): Es una medida de la concentración de iones hidronio (H_3O^+) en la disolución. Se determina mediante potenciómetro con electrodo selectivo (pHmetro).

b) Alcalinidad (UNE EN ISO 9963-1:1996 y UNE EN ISO 9963-2:1996): Es la capacidad del agua para neutralizar ácidos o aceptar protones, estando provocada mayoritariamente por los iones carbonato (CO_3^{2-}) y bicarbonato (HCO_3^-), aunque están también influida por el contenido en otros como boratos, fosfatos, silicatos y oxidrilos. Se determina por valoración con ácido, determinando los puntos de equivalencia mediante electrodo selectivo de pH o indicadores adecuados, obteniéndose de los puntos de inflexión o puntos de equivalencia los valores de alcalinidad compuesta (carbonatos $\text{pH} \approx 8,3$) y la alcalinidad total (bicarbonatos + carbonatos $\text{pH} \approx 4,5$).

c) Dureza: (UNE-ISO 6059:2014): Es otra forma de indicar el contenido iónico de un agua, refiriéndolo a la concentración total de iones calcio,

magnesio, estroncio y bario, aunque se debe fundamentalmente a los dos primeros.

d) Cloruro (Cl^-), cloro (Cl_2) e hipoclorito (ClO^-): La presencia de estas especies es, generalmente, debida a la cloración del agua para su desinfección, así como a procesos de salinización por aguas marinas. Los cloruros se determinan por valoración potenciométrica o fotométrica (UNE-ISO 9297:2013 y UNE 77042:2015). El cloro libre y combinado se determina por espectrofotometría visible (UNE-EN ISO 7393-2:2000).

e) Compuestos nitrogenados: amoníaco (NH_3), nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-): El amoníaco es uno de los compuestos intermedios formados durante la biodegradación de los compuestos orgánicos nitrogenados (aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc.) que forman parte de los seres vivos, y junto con el nitrógeno orgánico es un indicador de que un curso de agua ha sufrido una contaminación reciente. Ambas formas de nitrógeno se determinan frecuentemente en una sola medida (método Kjeldhal UNE 77028:2002 y UNE EN 25663:1994). La oxidación aeróbica de los compuestos amoniacales y orgánicos nitrogenados, conduce a la formación de nitritos y posteriormente de estos en nitratos, por lo que un elevado contenido en nitratos y simultáneamente bajo en amonio, indica que se trata de un agua contaminada hace tiempo. Tanto el amonio, como los nitritos y nitratos se pueden determinar mediante espectrofotometría de absorción uv-visible (UNE 77027:1982, UNE EN 26777:1994 y UNE EN ISO 13395:1997) o empleando potenciometría de electrodos selectivos.

f) Compuestos de fósforo. Una gran parte del fósforo presente en las aguas se debe al uso de abonos fosfatados y detergentes. La determinación se efectúa por espectrofotometría uv-visible (UNE-EN ISO 6878:2005 y UNE EN 1189:1997), siendo necesaria la digestión previa de los polifosfatos (constituyentes de los detergentes) en fosfatos, para su análisis posterior. El polifosfato también puede ser determinado por la norma UNE-EN 15041:2015.

g) Metales pesados: Entre ellos se incluyen elementos esenciales para la vida como el hierro junto con otros de gran toxicidad como el cadmio, cromo, mercurio, plomo, etc. Su presencia en agua es generalmente indicativa de un vertido de tipo industrial. Dada su gran toxicidad y que interfieren en los procesos de depuración (alteran los procesos de biodegradación) se hace necesaria su eliminación antes de los mismos. Para su determinación se emplea la muestra acuosa bruta, si ésta no presenta materia en suspensión (determinación de metales en disolución), en caso contrario habrá que someterla a digestión ácida (determinación de metales totales) hallando la cantidad de cada metal por espectroscopia de absorción atómica de llama o electrotérmica. En la actualidad (UNE-EN ISO 17294-1:2007, UNE-EN ISO 17294-2:2005 y UNE-EN ISO 11885:2010), el análisis de metales pesados se realiza por aplicación de la técnica espectrometría de emisión de plasma acoplado inductivamente con detección óptica (ICP-OES) y por espectrometría de masas (ICP-MS).

1.4.2.2. Orgánicos

A. Parámetros indicadores de la contaminación orgánica

Se enumeran a continuación algunos parámetros indicadores de la contaminación por compuestos orgánicos.

a) Oxígeno disuelto (OD): Es un parámetro indicativo de la calidad de un agua. Se determina "in situ" mediante método electroquímico por sonda (UNE-EN ISO 5814:2013) o por yodometría fijando el oxígeno con sulfato de manganeso (método Winkler) (UNE-EN 25813:1994), expresándolo como mg/L de oxígeno disuelto en la muestra de agua. También se puede medir por luminiscencia mediante el efecto Quenching, o utilizando medidores fotométricos que utilizan el método Winkler (modificado), muy utilizado hoy en día.

b) Demanda bioquímica de oxígeno (DBO) (UNE-EN 1899-1:1998 y UNE-EN-ISO 10707:1998): Es la cantidad de oxígeno necesaria para que los microorganismos aerobios puedan oxidar metabólicamente la materia orgánica

biooxidable presente en la muestra de agua. En la actualidad, se usan dos métodos: los manométricos, en los cuales el consumo de oxígeno se relaciona con la presión parcial de oxígeno contenido en la botella de incubación antes y después del ensayo. Y un segundo método de Winkler que permite determinar la cantidad de mg/l de oxígeno disuelto a través de una valoración química. También se puede medir el oxígeno con electrodo midiendo la reducción catódica.

- DBO_5 : variación de la corriente de OD determinada al cabo de cinco días en condiciones estándar, y que nos proporciona una idea del carbono orgánico biodegradable existente en la muestra. En estas condiciones de tiempo y temperatura se biooxidan aproximadamente los $2/3$ del carbono orgánico biodegradable total de un agua residual urbana estándar.
- DBO_{ult} : variación de la concentración de OD determinada al cabo de 21-28 días en las condiciones estándar del ensayo, siendo la suma de la materia hidrocarbonada y nitrogenada biooxidable. Hay países, norte de Europa, que utilizan la DBO_7 .

c) Demanda química de oxígeno (DQO) (UNE 77004:2002): es un parámetro que mide la cantidad de sustancias susceptibles de ser oxidadas por medios químicos que hay disueltas o en suspensión en una muestra líquida. La DQO se determina adicionando una cantidad medida de dicromato potásico ($K_2Cr_2O_7$) a un volumen conocido de muestra, acidulando el medio y manteniendo destilando a reflujo el sistema durante 2 horas. El dicromato sobrante de la oxidación de la materia orgánica se evalúa mediante un agente reductor (generalmente sulfato amónico ferroso). La diferencia entre la cantidad inicial de dicromato y la determinada por valoración con el agente reductor, es la consumida en la oxidación de la materia orgánica presente en el agua.

d) Carbono orgánico total (COT) (UNE-EN 1484:1998): Indica la cantidad total de carbono orgánico presente en una muestra, expresada en mg/L. En la actualidad existen equipos comerciales que proporcionan simultáneamente y como valores independientes el contenido total de carbono orgánico, junto al inorgánico y CO_2 disuelto. Es un método instrumental, basado en la combustión

total del carbono por oxidación a CO_2 ($T^a > 900 \text{ }^\circ\text{C}$) en presencia, si es necesario, de catalizadores de oxidación (V_2O_5). Se usan también muchos equipos que usan el punto crítico del agua, para esta determinación.

B. Compuestos orgánicos específicos

e) Aceites y grasas (UNE 77037:1983, UNE 77038:1983): Los aceites y grasas en los vertidos líquidos generan dos tipos de problemas a la hora de la depuración de las aguas residuales, disminución de la mojabilidad de los sólidos en suspensión impidiendo, con ello su sedimentación, y formación de una película que recubre los microorganismos encargados de la biodegradación, impidiendo con ello la captación de oxígeno por los mismos y disminuyendo su poder depurador. Los contaminantes totales se determinaron por extracción con disolvente, posterior evaporación del disolvente y pesada del residuo. Los compuestos específicos se determinan por métodos cromatográficos.

f) Fenoles: (UNE-ISO 6439:2013) Son hidroxiderivados del benceno y de compuestos aromáticos polinucleares. Suelen provenir de actividades industriales (plantas de coquización, refinerías, papeleras, etc.), degradación de productos fitosanitarios y de la descomposición de materia vegetal. Son extremadamente tóxicos, y su presencia en aguas sometidas a procesos de cloración produce compuestos clorofenólicos tóxicos y de gusto y sabor desagradable. Se determinan espectrofotométricamente a partir de compuestos de condensación del fenol con 4- amino antipirina, ya sea directamente o por extracción previa con cloroformo.

g) Detergentes (surfactantes y tensioactivos) UNE-EN 903:1994: Pueden ser de naturaleza aniónica, catiónica o neutra, siendo los primeros los más utilizados y los que determina la norma. La determinación de los contenidos totales, se efectúa por formación de complejos estables con azul de metileno (contraión catiónico) y extracción de estos con cloroformo, determinándose la concentración por espectroscopia UV-vis, por comparación con una curva de

calibrado. Para la determinación de los componentes específicos se emplean técnicas cromatográficas.

h) Hidrocarburos: Dentro de este grupo es de interés la determinación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs). Los PAHs son un grupo de sustancias químicas que se forman durante la incineración incompleta del carbón, el petróleo, el gas, la madera, las basuras y otras sustancias orgánicas, como el tabaco y la carne asada al carbón. Existen más de 100 clases diferentes de PAHs. Algunos se utilizan en medicinas y para la producción de tintas, plásticos y pesticidas. Otros se encuentran en el asfalto que se utiliza en la construcción de carreteras. Para el análisis de PAHs en aguas se utilizan distintos métodos de cromatografía de gases y de líquidos, previa extracción y purificación del extracto (UNE-EN 16691:2016; UNE-EN ISO 17993:2004; UNE-EN ISO 9377-2:2001). También es de interés la determinación de hidrocarburos aromáticos monocíclicos (UNE-EN ISO 15680:2004) y de hidrocarburos halogenados altamente volátiles (UNE-EN ISO 10301:1998), al igual que los PAH por técnicas cromatográficas con tratamiento previo de la muestra.

i) Plaguicidas: La determinación de residuos se realiza utilizando GC-MS y/o LC-MS /MS, para alimentos de origen vegetal se suele usar las normas UNE-EN 15662:2009 y UNE-EN 15637:2009, el proceso de extracción esta descrito en la UNE-EN 12393-1:2014 para plaguicidas organohalogenados, o organofosforados o organonitrogenados

1.4.2.3. Test de toxicidad

Los estudios de contaminantes, anteriormente expuestos, son sólo una parte de los posibles, pues en muchos casos hay que determinar la presencia de otras sustancias que alteren las propiedades del agua. Además, hay que tener en cuenta, que algunas sustancias pueden ver potenciado su papel contaminante al encontrarse en presencia de otras (sinergia), por lo cual se hacen imprescindibles otras formas de determinación del nivel de contaminación de un agua. Estos dos factores han llevado a desarrollar una

serie de test de toxicidad, encaminados no a la detección de un agente contaminante específico, sino a ver como se ha modificado por la utilización del agua la capacidad de la misma de desarrollar organismos vivos. Entre estos ensayos destacan:

- Estudios de biodiversidad.
- Ensayo de inhibición del crecimiento de pseudomonas (UNE-EN ISO 10712:1996).
- Ensayo de toxicidad aguda en dafnias (UNE-EN ISO 6341:2013).
- Inhibición de la respiración de lodos activos (UNE-EN ISO 8192:2007).
- Ensayo de toxicidad aguda en rotíferos.
- Ensayo de toxicidad aguda en tyamnocephlus.
- Ensayo de toxicidad aguda de los sedimentos marinos y de estuarios para los anfípodos (UNE-EN ISO 16712:2007).
- Ensayo de toxicidad letal aguda de sustancias frente a un pez de agua dulce (UNE-EN ISO 7346-1:1998, UNE-EN ISO 7346-2:1998 y UNE-EN ISO 7346-1:1998).
- Ensayo de toxicidad para la evaluación de la inhibición de la nitrificación de microorganismos de los lodos activados. (UNE-EN ISO 9509:2007).
- Evaluación de la genotoxicidad mediante la medida de la inducción de micronúcleos (UNE-EN ISO 21427-2:2009).

1.4.3. Parámetros microbiológicos

En el análisis microbiológico de las aguas puede seguirse la estrategia de una búsqueda directa de microorganismos patógenos específico, o bien realizar una búsqueda indirecta a través de determinados indicadores de contaminación. Lo usual es realizar primero la determinación de estos parámetros indicadores y en caso de que salgan positivos entonces se abordaría la búsqueda de microorganismos patógenos específicos. A continuación se enumeran los parámetros indicadores de contaminación fecal más frecuentemente utilizados.

A) Bacterias coliformes y *Escherichia coli* (*E. coli*): UNE EN ISO 9308:2014. El método consiste en la determinación del nº de coliformes mediante filtración de volúmenes determinados del agua a analizar por filtros de membrana e incubación sobre medio de lactosa enriquecido (agar de lactosa TTC con heptadecilsulfato de sodio) y una temperatura de 44,5°C (+/-0,2°C).

B) Enterococos: UNE EN ISO 7899-2:2001. Se utiliza para la determinación del número de enterococos intestinales mediante filtración de un volumen determinado del agua a analizar a través de filtros de membrana e incubación de los mismos sobre medios de cultivo a temperaturas adecuadas.

C) *Clostridium perfringens* (incluidas las esporas), método de filtración para la determinación del número de *C. perfringens* mediante filtración de un volumen determinado del agua a analizar a través de filtros de membrana e incubación de los mismos sobre medios de cultivo a temperaturas adecuadas.

D) Enumeración de microorganismos cultivables y recuento de colonias a 22°C: UNE-EN ISO 8199:2008. Este método se basa en contar el nº de colonias desarrolladas en una placa de medio de cultivo sólido, en el que se ha sembrado un volumen conocido de agua de la muestra, transcurrido un tiempo y una temperatura de incubación determinados.

Otros test complementarios pueden llevarse a cabo como son:

- Salmonelas
- Estafilococos patógenos
- Bacteriófagos fecales
- Enterovirus
- Protozoos
- Animálculos (gusanos-larvas), Invertebrados bénticos.

1.5. Contaminantes emergentes

El término de contaminantes emergentes (CEs) (Gil et al., 2012) generalmente se utiliza para referirse 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. Son compuestos de los que relativamente se conoce poco, en cuanto a su presencia, impacto y tratamiento, en la mayoría de los casos son contaminantes no regulados, que pueden ser candidatos a regulación futura, dependiendo de investigaciones sobre sus efectos potenciales en la salud (Stuart, 2012) y los datos de monitoreo con respecto a su incidencia. Por lo tanto, son susceptibles de investigación. La característica de estos grupos de contaminantes es que no necesitan estar constantemente en el ambiente para causar efectos negativos, puesto que sus altas tasas de transformación/remoción se pueden compensar por su introducción continua en el ambiente (Barceló, 2007). Se ha establecido que estos compuestos entran en el ambiente a través de algunas fuentes y vías, tales como: aguas residuales de tipo doméstico e industrial (Daughton, 2004; Fent et al., 2006), de los residuos de las plantas de tratamiento (Kolpin et al., 2002), de los efluentes hospitalarios (Kümmerer, 2001), de las actividades agrícolas y ganaderas (Watanabe, 2010) y de los tanques sépticos (Swartz, 2006), los cuales contienen un gran número de componentes orgánicos específicos y contaminantes emergentes que se producen a diferentes concentraciones en las aguas superficiales, cuyos criterios de calidad ambiental aún no se han podido especificar (Kaštelan-macan, 2007; Eggen et al., 2010). Las plantas de tratamiento convencionales de aguas residuales no están diseñadas para eliminarlos (Gerzabek, 2007; Pal, 2010); motivo de preocupación científica y para las entidades ambientales reguladoras.

Los contaminantes emergentes comprenden una amplia gama de compuestos químicos como son:

Productos farmacéuticos; La presencia de productos químicos farmacéuticos en el medio acuático ha sido reconocida como una

preocupación. Las vías principales de productos farmacéuticos en el medio ambiente son a través de la excreción humana, la eliminación de los productos no utilizados, por el uso ganadero, veterinario y agrícola (Poynton et al., 2009). En este grupo, se destacarían: Analgésicos, son uno de los fármacos de mayor consumo mundial y son considerados los de mayor automedicación. Antihipertensivos, son usados frecuentemente ya que la hipertensión arterial es la enfermedad cardiovascular más común en el mundo. Antibióticos, son fármacos de amplio uso en el mundo, su efecto contra microorganismos patógenos en animales y humanos, así como su uso para la preservación de alimentos, han incrementado su producción y consumo.

Drogas ilícitas y sus metabolitos son un gran grupo de contaminantes emergentes. Ellas entran a la red de aguas residuales como drogas inalteradas y/o sus metabolitos activos por excreción humana, saliva, y sudor, después del consumo ilegal o por la eliminación accidental o deliberada de los laboratorios clandestinos de drogas.

Hormonas esteroides; Son encontradas en las aguas, ya que naturalmente el hombre las contiene, se producen en células específicas de los testículos, la corteza adrenal, ovarios y placenta. Los testículos serían los encargados de segregar, principalmente, testosterona (andrógenos), la corteza adrenal produce la aldosterona, cortisol y la DHEA (dehidroepiandrosterona), los ovarios producen los estrógenos que engloban el estradiol, 4-androsteno-3, 17-diona y la progesterona, y por último estaría la placenta que también segrega estradiol y progesterona, pero además produce otra sustancia, el estriol. Igualmente existen hormonas sintéticas de amplio uso, entre las que se incluyen las píldoras anticonceptivas.

Compuestos de consumo humano; La cafeína, la nicotina, y el metabolito de la nicotina han sido ampliamente detectados en el agua subterránea impactada por aguas residuales. Godfrey, et al. 2007, Seiler, et al. 1999, Teijón, et al. 2010 y Van-Stempvoort, et al. 2011, encontraron altas concentraciones de los edulcorantes artificiales de acesulfame, sacarina, ciclamato y sucralosa en las aguas subterráneas afectadas por estanques de

infiltración de aguas residuales, y Buerge, et al. 2009, mostraron acesulfamo a ser ampliamente detectada en el medioambiente debido a su uso, la movilidad y la persistencia.

Retardantes de llama/fuego

La prevención de incendios en la industria ha disminuido gracias a la aplicación de retardantes de llama químicos en muchos productos industriales, utilizados en los últimos años. Aunque aportan en prevenir incendios, salvar vidas, prevenir daños, reducir costo económico por incendios (Birnbaum et al., 2004), los retardantes de llama, así como muchos otros productos químicos, no son eliminados totalmente en las plantas de tratamiento.

Los aditivos alimentarios

El citrato de trietilo se usa como aditivo alimentario para estabilizar espumas, por ejemplo, la clara de huevo; también se utiliza en recubrimientos farmacéuticos y como plastificante. Hidroxianisolbutilado (BHA) e hidroxitoluenobutilado (BHT) se utilizan para prevenir el deterioro de la grasa en alimentos. Otros aditivos alimentarios incluyen alcanfor, 1,8-cineol (eucaliptol), citral, citronelal, cis-3-hexenol, heliotropina, ácido hexanoico, mentol, alcohol feniletílico, triacetina, y terpineol. Algunos de estos pueden estar implicados como agentes oxidantes o disruptores endocrinos (Jobling, 1995).

Productos de cuidado personal e higiene

Los productos de cuidado personal son producidos para uso directo sobre el cuerpo humano. En general estos productos están dirigidos a alterar el olor, el aspecto, el tacto, y no deben mostrar actividad bioquímica significativa. Muchos de estos productos son usados como ingredientes activos o preservativos en cosméticos, productos de baño o fragancias. En ocasiones estas sustancias son usadas en cantidades mayores a las recomendadas (Daughton et al., 1999). Los productos de cuidado personal que forman parte de los contaminantes emergentes son: perfumes, fragancias, policíclicos y macrocíclicos; agentes de protección solar, Benzofenona,

metilbenzilidenecambor; repelentes de insectos: N, N-dietiltoluamida (Henríquez, 2010).

Los productos de cuidado personal se diferencian de los farmacéuticos ya que en grandes cantidades pueden ser directamente introducidos al ambiente, por ejemplo, estos productos pueden ser liberados dentro de las aguas recreacionales o volatilizados en el aire (Van-Stempvoort et al., 2011). Estos productos pueden afectar a los organismos acuáticos y a los humanos en ciertas concentraciones, estando presentes como: DEET (N,N-dietil-metaltoluamida), el ingrediente activo más común de los repelentes de insectos. Parabenos, esterres de alquilo del ácido p-hidroxibenzoico, utilizados desde los años 1930 como agentes bacteriostáticos y fungistáticos en medicamentos, cosméticos, y alimentos. Bactericida y agentes antifúngicos, triclosan, ampliamente utilizado en productos domésticos, tales como rociadores de dientes, jabón y anti-microbianas. Almizcles policíclicos, tonalide y galaxolide utilizados como fragancias en una amplia gama de agentes de lavado y de limpieza y de higiene personal. Filtros de protección solar UV, compuestos principalmente por aromáticos conjugados lipofílicos, detectados en medio acuoso (Jeon et al., 2006), filtros orgánicos que incluyen las benzofenonas y methoxycinnamates. Adicionalmente, en un estudio realizado por Lindström et al. 2002, detectaron triclosán y un metabolito el metiltriclosán, en aguas superficiales en Suiza. Asimismo, Heberer (2001), en una de sus investigaciones, muestra los resultados de las concentraciones de almizcles sintéticos que se encuentran en las aguas residuales, en los lodos de estas, en las aguas superficiales y muestras de biota, estas investigaciones se centraron en estudiar cómo afecta la bioacumulación de estos productos el metabolismo de los peces, y la evaluación del riesgo ambiental y humano.

Por estas razones, la mayoría de las nuevas investigaciones han centrado sus estudios en la aparición de estos contaminantes orgánicos en aguas superficiales, como las utilizadas en actividades domésticas, que luego reciben tratamiento químico; en aguas de arroyos (Yao, 2011); aguas residuales con tratamiento biológico (Rodríguez, 2012), y en agua potable de consumo humano (Jardim, 2012), entre otras, ya que estas son más

susceptibles de contener concentraciones mayores de CEs que las aguas subterráneas (Lapworth, 2012).

2. Propiedades, uso y clasificación de los almizcles

2.1. Introducción

Almizcle fue el nombre original que se le dio a la sustancia olorosa que se extraía de la glándula del ciervo macho almizcle. Se creía que tenía propiedades afrodisíacas y fue extensivamente usada como un fijador de fragancias hasta finales del 1800, cuando los problemas económicos y éticos llevaron al desarrollo de un sustituto sintético. El almizcle natural fue usado en la industria de los perfumes hasta 1979, cuando los ciervos fueron declarados como una especie en peligro de extinción por CITES (Convention on the International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna). La CITES continúa regulando la cantidad de almizcle natural que se puede comercializar, pero la caza furtiva del ciervo almizcle sigue siendo un problema.

El almizcle blanco es el nombre que se le da a la familia de los almizcles sintéticos que se usan en la fabricación de los perfumes modernos, el primero de los cuáles se hizo en 1890. A este almizcle se lo describe como limpio y "parecido a la piel" y se lo puede reconocer inmediatamente en las fragancias contemporáneas. Almizcles sintéticos se utilizan como aditivos de perfumes y compuestos fijadores según se describe en varios artículos de higiene, cuidado personal y productos para el hogar (Lu et al., 2011).

2.2. Consumo de almizcles

El uso masivo, generalizado y continuo de almizcles sintéticos y su naturaleza lipofílica hace que estos compuestos sean interesantes para futuras investigaciones incluyendo estudios sobre caracterización y evaluación de riesgos. Como se mencionó anteriormente, los productos de higiene personal

constituyen la principal fuente de contaminación del medio ambiente por estos compuestos y también la principal vía de exposición humana (Reiner y Kannan, 2006 y Roosens et al., 2007).

Aunque, los requisitos de etiquetado de cosméticos afirman que todos los productos de higiene personal producidos o distribuidos para la venta al por menor a los consumidores tienen una lista de ingredientes, ordenados por prevalencia (orden decreciente de peso), los ingredientes utilizados en las fragancias son considerados secretos comerciales y están exentos de estos requisitos de etiquetado (Parlamento Europea, 2009). Típicamente, las fragancias creadas para fines cosméticos están dominados por los ingredientes sintéticos, tales como los almizcles (Llompart et al., 2013). El término "perfume" o "aroma" por lo general se utilizan para representar esta compleja mezcla de productos químicos perfumados. Con el fin de asegurar la seguridad de los productos de acuerdo a las regulaciones y para evaluar el riesgo para la salud de las exposiciones potenciales, la determinación de los perfiles de concentración de almizcles sintéticos en formulaciones de productos de higiene personal es obligatoria.

Los almizcles policíclicos son principalmente galaxolide (HHCB) y tonalide (AHTN) y nitroalmizcles (principalmente almizcle xileno (MX) y almizcle cetona (MK)) (Clarke y Smith, 2011). Entre las diversas clases de almizcles sintéticos, HHCB, AHTN, MX y MK representan alrededor del 95% del mercado en Europa (Xiaonan et al., 2015), y aproximadamente el 74% es HHCB (Comisión OSPAR, 2004).

Para la evaluación de las fuentes de exposición humana y ambiental, se necesita la caracterización de los niveles de HHCB y AHTN en los productos de consumo. En general, el 77% de los productos para el hogar contienen almizcles policíclicos. Reiner y Kannan (2006), analizaron galaxolide (HHCB), tonalide (AHTN) y HHCB-lactona en 60 artículos de tocador y productos para el hogar en los EE.UU.. Ellos encontraron que las concentraciones detectadas de HHCB, AHTN y HHCB-lactona oscilaron entre $<5 \text{ ng g}^{-1}$ a 5 mg g^{-1} , $<5 \text{ ng g}^{-1}$ a 0.5 mg g^{-1} y $<5 \text{ ng g}^{-1}$ a 0.2 mg g^{-1} , respectivamente, y las

concentraciones más altas se encontraron en las muestras de loción / crema de perfume y corporales. Roosens et al. (2007), determinaron dos almizcles policíclicos (HHCB y AHTN) y dos nitroalmizcles (almizcle cetona, MK; xileno almizcle, MX) en 82 productos en Bélgica. Altas cantidades de almizcles sintéticos se determinaron en lociones, perfumes y desodorantes, para el cuerpo. HHCB y AHTN se detectaron con alta frecuencia y concentraciones, alcanzando el 22 y 8 mg/g, respectivamente. Estimaron que los perfiles de exposición esperados de estos compuestos, pueden llegar a un valor máximo de 35 mg g⁻¹. Se observaron tendencias similares en los productos comerciales de China (Lu et al., 2011 y Zhang et al., 2008) y también España (Llompert et al., 2013 y Sánchez-Prado et al., 2011). Sin embargo, Lu et al. (2011), determinaron una menor exposición dérmica para adultos (3.38 mg/día) en función de sus concentraciones medias y las cantidades de uso diario promedio de los productos de consumo. Correia et al. (2013), estudiaron la aparición de HHCB en 7 productos de cuidado personal de Portugal y comprobó que la crema corporal perfumada contenía la mayor concentración de este compuesto. Con la información sobre estos artículos de tocador, los autores estimaron una exposición dérmica diaria total de 904 mg de HHCB/día (equivalente a 15 mg/kg peso corporal/día). Nakata et al. (2015), informaron de la aparición y las concentraciones de macrocíclicos, policíclicos y nitroalmizcles en cosméticos y productos de uso doméstico de Japón. Del mismo modo, encontraron que HHCB es el almizcle predominante, presentando también los niveles de concentración más altos (hasta 15 mg/g en los perfumes). Las ingestas diarias estimadas de almizcle HHCB por la exposición dérmica a productos de cuidado personal eran alrededor de 8 mg/kg/día, mientras que para AHTN los valores fueron de entre 1 y 5 mg/kg/día.

Como puede verse, los estudios relativos a las distintas áreas geográficas (EE.UU., Europa, China o Japón) condujeron a resultados distintos. De hecho, esto refleja la dependencia entre el patrón de uso de almizcles sintéticos en los productos de cuidado personal y las diferentes regiones del mundo. Este patrón de uso se relaciona, no sólo con las distintas normativas vigentes en cada país, sino también con el uso de tasas diarias de los

productos, que están vinculados a los hábitos de la población. De hecho, esta información sobre la presencia y concentraciones de almizcles sintéticos en los productos de cuidado personal y también la exposición humana a través de la absorción dérmica son muy limitadas (Homem et al., 2015).

2.3. Clasificación de los almizcles

Los almizcles, se pueden clasificar por su estructura química, en cuatro clases principales (Homem et al., 2013; Homem et al., 2015 y Arbulu et al., 2011):

- Nitroalmizcles
- Policíclicos
- Macrocíclicos
- Alicíclicos

Nitrogenados o nitro-almizcles, se obtuvieron por Albert Baur en 1888 (Rimkus et al., 1995) por condensación de tolueno con bromuro de isobutilo en presencia de cloruro de aluminio, y el producto de nitración. Estos productos químicos son un componente antropogénico en composiciones fragantes (Ford et al., 2000). Almizcles Nitro generalmente se refieren a los cinco compuestos aromáticos más relevantes en el mercado: almizcle cetona (4-terc-butil-2,6-dimetil-3,5-dinitroacetophenone), almizcle ambreta (2,6-dinitro-3-metoxi-4-terc-butiltolueno), almizcle muscado (1, 1,3,3,5-pentametil-4,6-dinitro-2H-indeno), almizcle tibetano (1-terc-butil-3,4,5-trimetil-2,6-dinitrobenceno) y almizcle xileno (1-terc-butil-, 5-dimetil-2,4,6-trinitrobenceno). Son sustancias muy solubles en disolventes orgánicos, son lipofílicas y persistentes en tejido adiposo. Presentan alta estabilidad química, baja biodegradabilidad y alto potencial de bioacumulación. El uso de algunas de ellas está limitado, debido a que están en estudios por generar sospechas de inducir cáncer o aumentar el efecto carcinógeno de otros compuestos. Su producción hoy día, ha disminuido por su toxicidad tanto en el hombre como en el medioambiente.

Policíclicos, aparecen debido a la necesidad de eliminar el grupo funcional nitro de nitro-almizcles. Dicho grupo funcional presenta alta reactividad fotoquímica y es inestable en medio alcalino. Son sustancias cuya estructura principal es la molécula de indano o tetralina con numerosas sustituciones. Las características de este grupo, es que son sustancias muy solubles en disolventes orgánicos, son lipofílicas y persistentes en tejido adiposo. Presentan alta estabilidad química, baja biodegradabilidad y alto potencial de bioacumulación.

Los almizcle policíclicos llamados así porque tienen más de un anillo en su estructura molecular, se hicieron populares luego de la Segunda Guerra Mundial reemplazando a los nitroalmizcles, a través de su bajo costo de producción y una alta resistencia a la luz y alcalinos (Roosens et al., 2007). Son usados con frecuencia para aromatizar los detergentes para lavar y se los conoce con el nombre de galaxolide, tonalide, pantolide, celestolide y traesolide. Ellos han sido ampliamente utilizados, pero su detección en matrices ambientales y humanos, incluso como la sangre (Hutter et al., 2010; Hutter et al., 2005 y Hutter et al., 2009), la leche materna (Kang et al., 2010; Wang et al., 2011; Yin et al., 2012; Zhang et al., 2011 y Zhou et al., 2012) suero espinal y umbilical (Kang et al., 2010) despertó preocupación en la comunidad científica, y ello hizo instigar una disminución en los niveles de producción.

Macrocíclicos, grupo compuesto por un conjunto de almizcles sintéticos y naturales. Todos ellos, proceden del almizcle natural. Son cetonas macrólidas (origen animal), lactonas y bis-lactonas (origen vegetal). Tienen un elevado precio de producción, a pesar de que su producción sea fácil, ya que se trata de una descomposición microbiana de las mismas, afectando así a la estabilidad de dicho grupo, y presentan mayor biodegradación que los dos grupos anteriores. Aportan una ventaja importante, y es que a pesar de ser sintéticas, es el grupo menos perjudicial para la salud y el medioambiente.

El primero en sintetizar un compuesto en pequeñas cantidades, fue Leopold Ruzicka (1926), pero no fueron producidos comercialmente hasta fines

de 1990 debido a las dificultades en su fabricación que aumentaba el precio. Químicamente similares a los olores de almizcle naturales y, en consecuencia, parecen ser más fácilmente degradable en el medio ambiente (Bester, 2009). En un futuro próximo, se espera que la disminución en el precio de síntesis de estos almizcles acoplados a sus propiedades favorables al medio ambiente, favorecerá la sustitución por estos últimos.

Alicíclicos, son la 4^a generación de almizcles odorantes, pero su uso en productos de cuidado personal es todavía muy escaso.

A continuación se describen las propiedades de las fragancias que han sido estudiadas en este trabajo de Tesis Doctoral.

2.4. Principales almizcles

2.4.1. Tonalide

El nombre de IUPAC para esta fragancia es: 6-acetil-1,1,2,4,4,7-hexamethyltetraline; Se identifica por otros sinónimos más extendidos como son Tonalide o AHTN.

Su número CAS: 1506-02-1

Formula: C₁₈H₂₆O

Peso Molecular: 258.40 g/mol

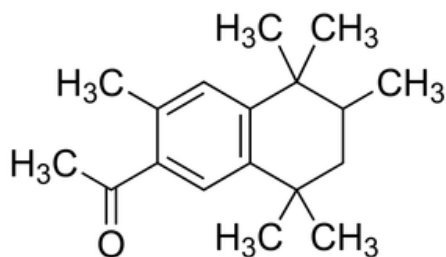


Figura I.1. Estructura molecular del tonalide

Esta sustancia presenta una pureza $\geq 98\%$. La estructura molecular de AHTN tiene un centro estereogénico por lo que hay dos enantiómeros, el isómero 3R y 3S. La relación de enantiómeros en AHTN técnica es 1: 1.

AHTN se produce en Europa, con un volumen de producción de 1000 a 5000 toneladas / año. Hacia 62% del volumen de la producción se exporta fuera de Europa. Según datos de evaluación de riesgos de REACH realizada en 2008.

El tonalide está clasificado como un almizcle policíclico igual que el galaxolide.

2.4.2. Galaxolide

El nombre de IUPAC para esta fragancia es: 1,3,4,6,7,8-hexahidro-4,6,6,7,8,8-hexametilciclopenta- γ -2-benzopirano. Se identifica por otros sinónimos más extendidos como son Galaxolide o HHCB.

Su número CAS: 1222-05-5

Formula: $C_{18}H_{26}O$

Peso Molecular: 258.40 g/mol

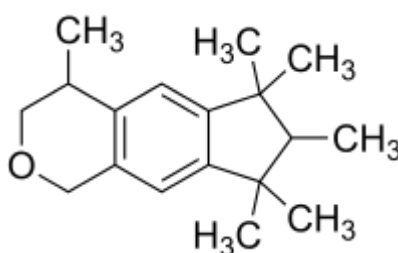


Figura I.2. Estructura molecular del galaxolide

Esta sustancia presenta una pureza $\geq 95\%$, suma de isómeros. Galaxolide es una mezcla de isómeros, tiene centros quirales en el 4 y 7-carbono. Los isómeros son (4R, 7R), (4R, 7S), (4S, 7S) y (4S, 7R). A temperatura ambiente se presenta como un líquido altamente viscoso. Punto de fusión es de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y el punto de ebullición se ha publicado un valor de 330

°C, re-calculado a partir de un punto de ebullición de 160 °C a 4hPa. Todos los datos químicos físicos se derivan del expediente de registro REACH Galaxolide (Frater, 1999).

HHCB es un almizcles policíclico, se usa como aceite de fragancias. Las fragancias son mezclas complejas de muchos ingredientes de fragancias en concentraciones variables. Los aceites de fragancia son utilizados en productos de consumo tales como perfumes, cosméticos, jabones, champús, detergentes, suavizantes, productos de limpieza del hogar, ambientadores, etc. El uso de estos productos de consumo se asocia sobre todo con el agua que se descarga al sistema de alcantarillado. Por lo tanto, hay que tener en consideración que la fase de eliminación ya está incluido en la fase de uso.

Los datos sobre el consumo de detergentes y cosméticos en la Unión Europea se clasifican según dos factores: El primer factor es de consumo de estos producto que es superior en el sur de Europa, siendo el mayor consumidor Italia seguido de España (AISE, 2001) .El segundo factor es en función de desarrollo del mercado, donde el mayor gasto en euros por habitantes, se corresponde a Dinamarca (COLIPA, 2004).

2.4.3. Almizcles Ambreta

El nombre de IUPAC para esta fragancia es: 4-Terc-butyl-3-metoxi-2,6-dinitrotolueno. Se identifica por otros sinónimos más extendidos como son Almizcle o almizcle ambreta (MA). Tiene un aspecto sólido de color amarillo pálido.

Su número CAS: 83-66-9

Formula: $C_{12}H_{16}N_2O_5$

Peso Molecular: 268.28 g/mol

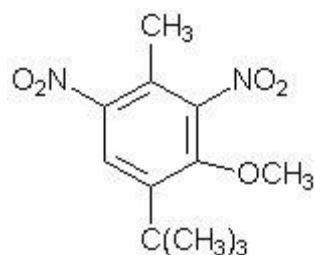


Figura I.3. Estructura molecular del almizcle ambreta

Almizcle ambreta era un ingrediente de fragancia utilizada para una amplia variedad de aplicaciones. Sin embargo, en 1992, ya no se utiliza en los Estados Unidos y su uso era muy limitado en Europa (Topfer, 1992). Almizcle ambreta se ha utilizado como una fragancia en productos como: jabón, detergente, cremas / lociones, y perfume (Opdyke, 1975). Almizcle ambreta también se ha utilizado en ciertas bebidas y alimentos en las siguientes concentraciones (ppm) (mg / kg): 0.10 ppm en bebidas alcohólicas, ; 0.18 ppm en bebidas no alcohólicas; 0.45 ppm en pudín de gelatina, 36 ppm en chicles y 423 ppm en caramelos (Flavor and Extract Manufacturers' Association, 1995).

Almizcle Ambreta ha tenido un uso discontinuado debido a que su consumo, se asoció con la debilidad de las extremidades traseras en ratas y se observaron cambios neuropatológicos en el cerebro, la médula espinal y los nervios periféricos (Spencer et al., 1984).

2.4.4. Almizcles Cetona

El nombre de IUPAC para esta fragancia es: 4'-terc-butyl-2', 6'-dimetil-3', 5'-dinitroacetophenone; Se identifica por otros sinónimos más extendidos como son almizcle o almizcle cetona (MK).

Su número CAS: 81-14-1

Formula: $C_{14}H_{18}N_2O_5$

Peso Molecular: 294.31 g/mol

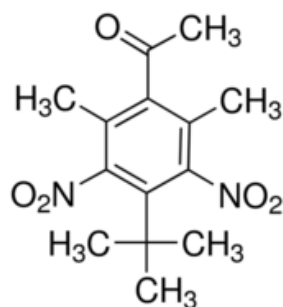


Figura I.4. Estructura molecular del almizcles cetona

Es un sólido cristalino que se utiliza como ingrediente en composiciones de fragancia. Son casi siempre líquidos, en el que almizcle cetona tiene que ser disuelto. Se utiliza en parte en productos cosméticos y en detergentes, suavizantes, productos de limpieza y otros productos perfumados.

El volumen de importación de la UE para el almizcle cetona asciende a 35 toneladas/año (año 2000). Almizcle cetona se importa como un polvo cristalino. A temperatura ambiente, la sustancia tiene una presión de vapor muy baja, por lo que la exposición por inhalación al vapor es probablemente insignificante, pero la exposición al polvo puede ser posible. Los compuestos de fragancia son probablemente mezclas que los clientes demandan y la cantidad de almizcle cetona añadida puede variar de lote a lote. La exposición puede ocurrir durante el pesaje y la adición del sólido al líquido.

2.4.5. Almizcles Xileno

El nombre de IUPAC para esta fragancia es: 5-terc-butyl-2,4,6-trinitro-meta-xileno; Se identifica por otros sinónimos más extendidos como son Almizcle o almizcle xileno (MX).

Su número CAS: 81-15-2

Formula: $C_{12}H_{15}N_3O_6$

Peso Molecular: 297.27 g/mol

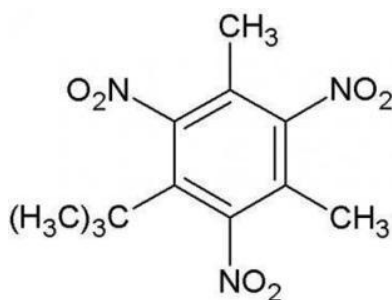


Figura I.5. Estructura molecular del almizcle xileno

Almizcle Xileno es un ingrediente de fragancia utilizada en compuestos como: jabón de tocador, champú, crema para la piel, desodorante, para después del afeitado, colonia y perfumes. Ha estado en uso desde el año 1900 y su uso en la Unión Europea es de 200 toneladas por año (REACH, 2005).

En 1987, los nitro-almizcles constituían alrededor del 35% del volumen de producción mundial, de aproximadamente 7.000 toneladas al año de productos químicos aromáticos. La mayoría de los compuestos de almizcle eran producidos en Europa occidental, donde la capacidad excede la demanda en un 25%. En 1987, superó la demanda de almizcle en los Estados Unidos de América la producción nacional en un 100%; casi el 60% del volumen consumido fue importado, con aproximadamente el 40% de las importaciones de nitro-almizcle procedentes de China. Hasta mediados de la década de 1980, China e India produjo sólo nitro-almizcles (Anon, 1988; Barbetta et al., 1988).

A principios de la década de 1990, la producción anual mundial de nitro-almizcles se había reducido 1.000 toneladas, de las cuales el 67% era almizcle xileno, 21% de almizcle cetona y 12% almizcle ambreta (Qinghua, 1993; Ippen, 1994). Almizcle ambreta se produce principalmente en China y la India para los mercados internacionales.

Almizcle cetona y xileno siguen siendo utilizados como aditivos en detergentes, suavizante de telas, productos de limpieza para el hogar y otros productos no cosméticos perfumados. El almizcle xileno es el almizcle nitro más utilizado (Roosens, 2007).

3. Efectos y niveles de fragancias en aguas

3.1. Efecto de las fragancias sobre la salud

Diferentes estudios han demostrado que algunos de estos compuestos pueden causar efectos adversos a la salud, como la genotoxicidad, que incluso podría dar lugar a efectos mutagénicos o cancerígenos, o estrogenicidad debido a su actividad de alteración endocrina (Jiménez et al., 2014).

El uso de nitroalmizcles conduce a la exposición directa a través de la absorción dérmica, así como la inhalación de polvo contaminado y fragancias volatilizada. La evidencia también sugiere que los seres humanos están expuestos a dosis bajas de estas sustancias químicas a través de la absorción oral de líquidos y alimentos contaminados. Como estos compuestos son lipofílicos, ellos y sus metabolitos, se han encontrado no solo en sangre, sino también en leche materna y tejido adiposo. Después de su uso personal, estos contaminantes persistentes ambientalmente luego pasan a través de plantas de tratamiento de aguas residuales a través de sus efluentes al medio ambiente (Birkhol et al., 2014).

Las tres rutas principales de exposición a los almizcles nitro son por inhalación, absorción cutánea e ingestión, (Lu et al., 2011). En pruebas de polvo a partir de una muestra aleatoria en hogares se encontró almizcle cetona en el 98,7% de los hogares con una concentración media de 13,7 ng / g y almizcle xileno a una concentración media de 11,8 ng / g en el 86,4% de los hogares. Esto plantea la preocupación por la inhalación de almizcles nitro a través del polvo residual en el hogar. Sin embargo, la exposición humana a los almizcles nitro través de la inhalación del medio ambiente se ha demostrado ser mínimo lo que sugiere que la inhalación del uso directo es probablemente una exposición más importante (Sofuoglu et al., 2010).

Las altas frecuencias de alergia por contacto a ingredientes de la fragancia se han reportado en los últimos años. Aproximadamente el 70-80% son detectados por la alérgenos en pruebas de parche estándar.

El almizcle ambreta causó una alta incidencia de fotoalergia. Los almizcles tibetano y muscado dieron negativos para fototoxicidad, fotoalergenicidad y baja sensibilidad en contacto en las condiciones de ensayo. El almizcle xileno ha demostrado ser un sensibilizador de contacto débil. Almizcle cetona es una fototoxina débil y un sensibilizador por contacto débil. Este último no fue afectado por exposición a la luz. Estos datos sugieren que a excepción de almizcle ambreta, los nitro almizcles, como grupo, no tienen el potencial de producir fotoalergia. Estas últimas cualidades biológicas no se han manifestado clínicamente (Parker et al., 1986).

En la población española en el año 2003, las cantidades de almizcles utilizada es de 110-450 kg/día (Carballa et al., 2008). El biomonitoreo es una herramienta muy útil para evaluar la exposición humana a contaminantes ambientales (Yusa et al., 2012). Las mediciones se toman principalmente en la orina, la sangre y la leche materna.

Se detectaron concentraciones medias más altas de almizcles sintéticos totales en perfumes (5245,05 mg/g) y champús (487,67 mg/g) para adultos. Galaxolido, exaltolida y cashmeran eran los compuestos más detectados. La combinación de estos resultados con las cantidades de uso diario, se logró una exposición media diaria dérmica de 75.69 mg/kg de peso corporal/día para adultos y 15,54 g/kg/día para los bebés/ niños. Los principales contribuyentes para adultos y bebés/niños era a exposición cutánea de perfumes y lociones, respectivamente (Homem et al., 2015).

En un informe de evaluación de las concentraciones de los almizcles sintéticos en productos de cuidado personal en China, Lu et al. (2011), encontraron almizcle xileno en el 19% de los productos y encontraron almizcle cetona en el 57% de los productos probados. Estos productos incluyen productos de cuidado del cabello, jabones líquidos, jabones de tocador, lociones para la piel y maquillaje. La mayor concentración de almizcle xileno se encontró en lociones para la piel con una concentración media de 0,16 µg / g de loción. La mayor concentración de almizcle cetona se encuentra en los productos de cuidado del cabello con una concentración media de 8,12 µg / g de producto.

La exposición dérmica a las fragancias se pensaba que era una ruta importante de exposición a almizcles. Sin embargo, las evidencias sugieren que la absorción por vía dérmica es baja. En un estudio realizado por Hawkins et al. (2002), almizcles cetona y xileno se aplicaron por separado por vía dérmica a las espaldas de los siete participantes, el estudio encontró que después de 6 horas, fueron capaces de recuperar el 86% del almizcle cetona aplicado, encontrando el 0,49% en la orina y menos de 0,01% en las heces. Del almizcle xileno fueron capaces de recuperar del 90 a 94% de la espalda, del 0,2-0,3% se excreto en la orina y nada se encontró en las heces. En ningún caso se detecto en la sangre. Hutter et al. (2009), llegó a conclusiones similares, cuando evaluaron la asociación entre la absorción dérmica a través del uso de cosméticos y los niveles sanguíneos. Lignell et al. (2008), examinaron el efecto de la absorción dérmica de almizcles nitro mediante la aplicación de perfumes en las mujeres en periodo de lactancia. Ellos encontraron que el uso de perfumes durante el embarazo no fue predictivo de los niveles de almizcles en la leche materna. Sin embargo, Eisenhardt et al.(2001), encontraron que los niveles sanguíneos en nitroalmizcle, se asociaron con el uso de cosméticos, en particular con el uso de perfumes, lo que sugiere una asociación con la absorción dérmica, pero también podría ser debido a la inhalación.

Teniendo en cuenta que la mayoría de los almizcles nitro han sido sustituidos por los almizcles policíclicos en muchos productos aplicados por vía dérmica, la exposición oral a través del agua o alimentos contaminados podría ser un gran contribuyente a la presencia nitro almizcle en la sangre, la leche materna, y linfocitos (Roosens et al., 2007). Esto es apoyado por un estudio realizado por Riedel y Dekant (1999), en el que tanto por vía dérmica, como exposiciones orales a almizcle xileno fueron evaluados en 12 voluntarios a través de una exposición de 96 horas. El porcentaje de dosis administrada que se encuentra en plasma fue de un orden de magnitud mayor para la exposición oral en comparación con la exposición cutánea. Almizcles Nitro se han encontrado en concentraciones que van desde por debajo del límite de detección de 470 ng / g de peso en lípidos en las muestras de peces de agua

dulce, como resultado de la escorrentía de aguas residuales en los sistemas acuáticos. Debido a esto el consumo de pescado contaminado puede ser una exposición importante a considerar (Zhang et al., 2013). Sin embargo, mientras que los niveles de almizcles nitro variable se han encontrado en muestras de peces, Kafferlein y Angerer (1999), encontraron que la ingesta dietética de pescado, evaluada mediante un cuestionario de frecuencia de alimentos, no se correlaciona con los niveles sanguíneos de almizcles (Rimkus et al., 1995; Yamagishi et al., 1983) .

En el estudio realizado por Eisenhardt et al. (2001), analizaron la asociación entre el almizcle cetona y xileno en niveles sanguíneos y problemas endocrino y ginecológicos en las mujeres premenopáusicas en una clínica endocrinológica ambulatoria. Ellos encontraron que las mujeres con síndrome premenstrual tenían en promedio 24 ng almizcle cetona por litro de sangre mayor que las otras mujeres. También encontraron que los niveles de almizcle xileno se asoció inversamente con los niveles de las hormonas de la fase lútea, la progesterona y los estrógenos. Las mujeres que se presentaron como infértiles tenían niveles séricos de 23,5 ng / L más altos de almizcle xileno que los que ya había estado embarazada una vez. Sin embargo, dado que los almizcles nitro son lipofílicos los niveles más bajos de almizcle xileno en mujeres fértiles posiblemente se explica por la eliminación de almizcle nitro a través de la lactancia materna. Estos hallazgos son indicativos que los almizcles nitro pueden ser disruptores de hormona hipotalámica de ovario y se necesita más investigación para evaluar esta relación.

3.2. Relación entre estudios de animales y personas

El uso de modelos animales y estudios de laboratorio es importante para el proceso de evaluación de riesgos. Sin embargo, puede ser difícil extrapolar cómo estos estudios se aplican a las exposiciones diarias típicas de los seres humanos. Almizcles nitro se han encontrado en los sistemas acuáticos a concentraciones bajas, aunque los humanos tienen significativamente más masa corporal que los animales en estudio, los estudios pueden no ser

aplicables a la exposición en humano. Al mismo tiempo, muchos de estos estudios de animal implicados son a exposiciones de corta duración. Aunque la exposición humana sea probablemente en dosis más bajas, y también es probable que sea a largo plazo.

El cuerpo de la literatura apoya la conclusión de que no sólo estamos siendo expuestos a los almizcles nitro, que son bioacumulable y se transmiten a nuestros hijos a través de la leche materna y exposiciones perinatales. Mientras que los estudios en animales no abordan los efectos de dosis bajas a largo plazo, ellos indican que un área particular del enfoque de los resultados de salud de la exposición a almizcle nitro debe ser la génesis de tumores y cáncer. Aunque los estudios en animales fueron conflictivos para los efectos potenciales de desarrollo, esta falta de acuerdo indica que se necesita investigar más en este campo. Efectos endocrinos en humanos se han visto en las exposiciones de almizcle nitro; esto indica que se necesitan más estudios por hacer en los animales y los seres humanos a niveles de exposición de relevancia ambiental. A la luz de la evidencia, el principio de precaución se debe tomar en cuenta. Esto se puede hacer a través de una reducción en el uso y la producción de productos que contienen almizcle nitro (Taylor et al., 2014).

3.3. Efecto de las fragancias sobre el medioambiente acuático

Las fragancias de origen sintético entran en cantidades significativas en el medio acuático y dado su carácter apolar, acaban acumulándose en la fauna acuática en concentraciones importantes. En Europa, se ha reducido considerablemente la utilización de fragancias nitrogenadas (almizcle xileno y almizcle cetona) debido a su toxicidad ambiental, y éstas se han sustituido por las llamadas fragancias policíclicas (mayoritariamente galaxolide, tonalide) (Schnell et al., 2009).

A) Peces

Almizcle sintético, inicialmente almizcle xileno y cetona, fueron detectados e identificados la primera vez en 1981 en peces de agua dulce desde el río de Tama en Tokio (Yamagishi et al., 1981). Unos años después, análisis de músculo de pescado, vísceras de pescado, mejillones, agua y aguas residuales del mismo río (Yamagishi et al., 1983) indicaron que el almizcle xileno y cetona se acumulaba en los tejidos lipofílicos en la biota. Diez años después, almizcles nitro fueron identificados en el medio ambiente acuático y los tejidos lipófilos, cuando Rimkus y Wolf (1993; 1995), analizaron peces, mejillones y camarones de varios lugares y comenzaron una discusión amplia en el campo. Al mismo tiempo, otros autores publicaron datos sobre niveles de almizcles policíclicos en los peces, las aguas superficiales y aguas residuales (Eschke et al., 1994;1995). Posteriormente, (Draisci et al., 1998; Rimkus, 1999; Gatermann et al., 1999; Gatermann et al., 2002a), se confirmó la presencia de fragancias sintéticas de almizcle en el medio acuático y con niveles mayores de almizcles policíclicos que de nitroalmizcles. Se especuló que el pescado para alimentación podría ser la fuente de contaminación de almizcle xileno, pero el análisis de alimentos para peces (n = 175) que se utiliza en Dinamarca en 1992 mostró que los piensos para peces sólo contenía un promedio de concentración bajo de almizcle xileno de 1,2 µg / kg (Green,1994). Se considero que la fuente de los compuestos de almizcle podría ser debida a la contaminación ambiental.

Se han detectado nitro almizcle y almizcle policíclicos en truchas de piscifactoría y en la leche materna de las madres primíparas. El almizcle policíclico, HHCB, predomino sobre los compuestos de almizcle sintético encontrados en las muestras de trucha a partir de 1999 con una concentración media de 5.0 µg / kg de peso fresco y en las muestras de trucha recogidas en 2003 y 2004 con concentraciones medias de 1,2 µg / kg de peso fresco. También se encontró almizcle xileno en las truchas muestreadas en la misma granja de peces (Duedahl-Olesen et al., 2005)

El estudio del efecto de estas fragancias en carpas pone de manifiesto entre otros aspectos, la mayor capacidad de las fragancias nitrogenadas de

interferir con el metabolismo de xenobióticos, estas fragancias pueden interferir con la capacidad del pez de metabolizar y excretar otros contaminantes a los que estén expuestos. Por el contrario, las fragancias policíclicas muestran una mayor capacidad de interferir con actividades enzimáticas implicadas en la síntesis y metabolismo de hormonas, y por tanto un mayor potencial de alterar el sistema endocrino de peces expuestos (Schnellet al., 2009).

Las aguas residuales constituyen un 14% de la descarga total a los ríos. Un total de 251 truchas marrones (rio Ammer, Alemania) fueron capturados en dos campañas en octubre de 2010 con 12 puntos de muestreo. Las concentraciones medias de HHCB y AHTN en las truchas aguas abajo de las EDAR se incrementaron significativamente a 10,8 mg / g y 3,7 mg / g de peso en lípidos, respectivamente(Lange et al., 2014)

Salmonetes se mantuvieron y se alimentaron en un acuario limpio durante dos semanas para depurar a fondo antes de la extracción de la bilis. También se calculó la concentración de los analitos en la bilis limpia. Se encontró en las muestras de bilis: DEHP (0,68 ng/mL), BPA (0,24 ng/mL), la mezcla de NP (0,15 ng/mL), HHCB (0,15 ng/mL) y clorpirifos (0,14 ng/mL) (Ros et al., 2015).

En España, fueron estudiados los almizcles presentes en el pescado en muestras del mercado local en Tarragona y en muestras de peces del río Ebro. Los resultados mostraron la presencia de galaxolide (2.97-18.04 ng/g) y tonalide (1.17-8.42 ng/g) en todas las muestras analizadas, mientras que los restantes almizcles policíclicos tales como cashmeran, Celestolide y phantolide, solamente se detectaron en algunas de las muestras de pescado analizadas. Ninguna de las muestras analizadas contenía trazas detectables de los nitro almizcles (Vallencillos et al., 2015). El HHCB fue el mayor contribuyente, con niveles máximos en la sardina y la caballa (367 y 304 ng/g), respectivamente. Las concentraciones actuales de almizcles en pescados y mariscos (Merluza, Bacalao, Camarones, Calamar, Salmon, Atún, Caballa, Sardinias y Mejillones) no deben significar riesgos para la salud humana para la población que vive en Tarragona (Trabalon et al., 2015).

B) Mariscos

Los mariscos son uno de los alimentos básicos más importantes en el mundo y, sin duda, uno de los más propensos a la bioacumulación de PCP. Evaluar la presencia de almizcle en mariscos y macroalgas recogidos en diferentes puntos de Europa (áreas con altos niveles de contaminación, altamente pobladas y cerca de las plantas de tratamiento de aguas residuales).

Los principales tipos de mariscos que se consumen en Francia son las ostras, mejillones, caracoles, caracolas, berberechos, almejas, vieiras y otros. Mariscos que filtran grandes volúmenes de agua para extraer su alimento y son excelentes bioacumuladores, de metales y otros contaminantes que existen en el medio marino. En los mariscos, la acumulación ocurre a menudo en las glándulas digestivas, que desempeñan un papel en la asimilación, excreción, y la desintoxicación de contaminantes. Las concentraciones de contaminantes químicos en los moluscos bivalvos se sabe que fluctúan con las estaciones del año (Gueguen et al., 2011).

En muestras de ostras se detectaron concentraciones de AHTN 0,4 y 2,7 ng/g, respectivamente (Shin-Fang et al., 2012). Estos rangos de concentración fueron similares a las obtenidas en estudios previos. Como ejemplos, las concentraciones de HHCB y AHTN en mejillones azules del Mar del Norte oscilan entre no detectados y 2,5 ng/g (Rüdel et al., 2006), y las concentraciones de HHCB y AHTN en ostras del Mar de Ariake (Japón) fueron de $9,1 \pm 4,3$ y $1,1 \pm 0,82$ ng/g, respectivamente (Nakata et al., 2007).

Se analizaron tres tipos de muestras (mejillón, salmonete y almejas). Galaxolide (HHCB) y tonalide (AHTN) fueron las fragancias más detectados y cuantificadas en las muestras. Se encontró que los niveles más altos de HHCB y AHTN en mejillones del estuario del Po (Cunha et al., 2015) y almejas de Delta del Ebro, con valores respectivos de 34,52 y 33,10 ng/g. Los valores más bajos de HHCB en mejillones se cuantificaron en muestras de Estuario del Tajo y el Delta del Ebro. AHTN se distribuyó de manera similar en la misma especie, pero en concentraciones más bajas, con la excepción de almejas, donde no se cuantificó. Estas concentraciones son mayores que los reportados por Kannan

et al. (2005), en los filetes de salmón del Atlántico y los hígados de tiburones sharpnose o lobina de boca chica del Atlántico recogidos de Estados Unidos con los valores máximos de concentración que oscilan entre 3,2 y 5,4 ng/g para HHCB, y entre 1,6 y 1,9 ng/g para AHTN. Mientras, los niveles de HHCB se encuentran en mejillones del Estuario del Tajo (13,32 ng/g) y del estuario Ebro (8.68 ng/g) fueron comparables con las concentraciones encontradas en HHCB mejillones desde el sur de Portugal (valores en torno al 12 ng / g (peso seco)) (Picot et al., 2014) .

Se realizaron ensayo de toxicidad para crustáceos durante un ciclo de vida completo (26 días de exposición), con la finalidad de estudiar los efectos de un nitro almizcle (almizcle cetona), así como tres almizcles policíclicos (tonalide, Celestolide y Galaxolide). Se demostró que ninguno de los cuatro almizcles tenía ninguna actividad agonista o antagonista. Esto indico que la disminución en la tasa de desarrollo de las larvas fue debido a efectos farmacológicos. Concluyen que existe poco riesgo de que los almizcles sintéticos sean perjudiciales para los copépodos en concentraciones ambientales (Breitholtz et al., 2003).

Se analizaron 68 mejillones verdes y azules recogidos de Camboya, China, Hong Kong, India, Indonesia, Japón, Corea, Malasia, Filipinas, Vietnam y EE.UU. durante 2003 y 2007, para dilucidar la ocurrencia y la distribución generalizada de contaminantes emergentes. Almizcles sintéticos, se detectaron en los mejillones de todos los países, lo que sugiere su contaminación ubicua y amplia distribución. Las mayores concentraciones de almizcles, se detectaron en mejillones procedentes de Japón y Corea (Nakata et al., 2011). En Corea se investigó los niveles de concentración de HHCB, AHTN, MK y MX, en sedimentos costeros y bivalvos de agua dulce. Los niveles de concentración de las aguas dulces cerca de las plantas de tratamiento de aguas residuales mostraron mayor contaminación, lo que sugiere un alto riesgo ecológico, especialmente debido al MK aportando más del 65% de riesgo. Se determinó que la bioacumulación se debe estudiar teniendo en consideración la relación entre los sedimentos costeros y los bivalvos (Lee et al., 2014).

Parolini et al. (2015), indican que las concentraciones de HHCB y AHTN que se pueden encontrar en los sistemas acuáticos, producen daño genético en el mejillón cebra, lo que sugiere la implicación del estrés oxidativo. En general, aunque las concentraciones más baja probada de estos almizcles no causaron efectos oxidativos o genotóxicos graves en las muestras, exposiciones de 21 días a la más alta concentraciones de HHCB y AHTN inducen la peroxidación lipídica, carbonilación de proteínas y daño genético primario. AHTN es el almizcle más tóxico para el mejillón cebra. El peligro en los invertebrados acuáticos no debe ser subestimado, ya que los bivalvos han estado expuestos a concentraciones de HHCB y AHTN comparables a los niveles ambientales actuales. Se debe considerar que en los ecosistemas naturales, los organismos acuáticos están expuestos a HHCB y AHTN durante toda su vida útil, lo que puede resultar un aumento de la toxicidad.

Estudios similares realizados en gusanos marinos, que desarrollan su vida en fangos o lodos, durante 120 días, que constituye su ciclo de vida, para investigar los efectos del HHCB. La exposición al HHCB no mostró efectos detectables sobre la supervivencia de adultos, la edad en la primera reproducción, la duración del período reproductivo, número de crías, o tamaño específico del cuerpo. En contraste, HHCB afectó significativamente la supervivencia juvenil (≥ 123 mg/kg), al tiempo de maduración (≥ 168 mg/kg), el número total de huevos producidos (≥ 26 mg/kg), al tamaño de la camada (≥ 123 mg/kg) y ocasionalmente aumento del tiempo entre intentos de cría (≥ 26 mg/kg). Se observó una tendencia a la baja de la tasa de crecimiento de la población con concentraciones crecientes de HHCB, pero las diferencias entre el control y los grupos expuestos no fueron significativas. Por lo tanto, a pesar de los efectos detectables en el historial de vida debido al HHCB, los resultados sugieren que las concentraciones ambientales reales de HHCB no es probable que reduzcan la tasa de crecimiento de las poblaciones de *Capitella* (Ramskov et al., 2009).

3.4. Efecto de las fragancias sobre plantas y animales terrestres

En el medio ambiente terrestre, también impone un riesgo potencial para las especies (Balk y Ford, 1999; Chen et al., 2011 y Liu et al., 2011), fueron comprobados efectos de toxicidad de HHCB en la longitud de los brotes y de raíces de ocho especies de plantas. Aunque la germinación de las plantas no se vio afectada y tampoco la aparición de semillas se vio afectada significativamente por la exposición HHCB. En cuanto a los invertebrados terrestres, el HHCB causó efecto tóxico sobre la reproducción y el crecimiento de caracoles y lombrices (Wang et al., 2015). Además de efectos adversos del HHCB sobre el sistema antioxidante y la génica de lombrices.

La prueba springtail se llevó a cabo de acuerdo con el proyecto de la norma ISO / CD 11267 (Klepka, 1997a; 1997b). Colémbolos juveniles de las especies *Candida Folsomia* con 10-12 días de edad se colocaron en un suelo artificial; la supervivencia y la reproducción se determinaron después de 28 días. El suelo artificial fue el mismo que el utilizado en el estudio lombriz de tierra. Concentraciones de ensayo nominales fueron 1, 3, 8, 19, 45 y 105 mg/kg de suelo. Después de la preparación de las concentraciones de ensayo y un periodo de equilibrio de 1 semana, se añadieron los organismos de prueba al suelo.

Para AHTN y HHCB, estudios orales subcrónicos están disponibles para ratas (Hopkins y Lambert, 1996; Api y Ford, 1999). AHTN se administró en la dieta de ratas (15 machos y 15 hembras por grupo) a dosis diarias de 1,5, 5, 15 y 50 mg/kg para 13 semanas. HHCB se ensayó mediante un protocolo idéntico, pero a dosis de 5, 15, 50 y 150 mg / kg por día. Los cocientes de riesgos para los depredadores sobre los organismos acuáticos y del suelo están todos por debajo de 0,01 para AHTN así como para HHCB. Teniendo en cuenta el enfoque en gran medida conservadora dado por los organismos del suelo y sedimentos, estos datos son tranquilizadores que estas sustancias no plantean un riesgo ambiental.

Las aguas residuales han sido utilizadas para regar de forma continua durante más de 45 años (por ejemplo en Alemania) (Ternes et al., 2007). La

determinación en los cultivos es necesaria para la evaluación de exposición humana (Matamoros et al., 2012). Aunque hay algunos estudios sobre la absorción de PCP por cultivos. Litz et al. (2007), determinaron la captación de las fragancias almizcle por la lechuga y las zanahorias en experimentos en laboratorio y al aire libre. Llegando a la conclusión de que una cantidad considerable de galaxolide (HHCB) y tonalide (AHTN) fueron tomadas sólo por las raíces de zanahoria. Teniendo en cuenta que la ingesta diaria media de estos compuestos a través de las verduras (la OMS recomienda un consumo mínimo de 400 g por persona al día de frutas y verduras) regadas con aguas que contienen estos compuestos, se espera que sea aproximadamente 500 ng por compuesto, extremadamente bajo en comparación a la dosis terapéutica mínima, por lo general el rango es de mg.

3.5. Presencia de fragancias en la nieve y el aire

No solo se encuentran las fragancias en el agua o lodos provenientes de EDAR en el medioambiente, sino que también se detecto la presencia de las fragancias Tonalide y Galaxolide en muestras de nieve.

Siendo una fuente secundaria interesante de almizcles para el medio ambiente, específicamente almizcle cetona, puede ser la fusión de los glaciares. Esto se demostró en Lake Oberaar, un lago glaciar alimentado donde se detectaron picos de contaminantes orgánicos persistentes en la escorrentía glaciar (Bogdal et al., 2009). Esto fue visto incluso para los contaminantes cuyo uso siempre había sido discontinuo. Esto sugiere que incluso si la producción de almizcle nitro se suspendió todavía hay una exposición potencial.

Las concentraciones obtenidas eran de ng/L de los dos almizcles policíclicos en las muestras de nieve del glaciar Forni (Villa et al., 2014). Estudios de Hu et al. (2012), tomaron muestras de nieve dentro de la zona urbana de Beijing en China, cerca de muchas fuentes de emisión. En principio, es razonable que las concentraciones en zonas remotas deben ser inferiores a los detectados en las zonas urbanas altamente pobladas como Beijing. Además, China también está experimentando una tendencia creciente de

consumo de los PCP (Productos Cuidado Personal) (Whiteman y Krug, 2008). Sin embargo, los niveles HHCB y AHTN encontrados en las muestras de nieve de la zona de Beijing son un promedio de sólo 2.4 veces mayor, lo que indica sorprendentemente altas concentraciones de ambas sustancias en el glaciar Forni. Los datos son similares a los datos reportados por Xie, et al. (2007), en la zona del Mar del Norte. Los autores también indicaron que HHCB se elimina más rápidamente durante el transporte atmosférico que el AHTN, probablemente debido a una cinética más rápida de la reacción con radicales OH.

Tonalide y Galaxolide, entre otros compuestos, fueron detectados en muestras de polvo recogidas en interiores en viviendas francesas (Bretaña) entre septiembre de 2009 y octubre de 2012, obteniendo concentraciones de almizcles de varios cientos de ng/g a varios mg/g, sería otra forma de entrada de fragancias al cuerpo humano a través de la inhalación o por ingestión en las manos, sobre todo de los niños pequeños (Mercier et al., 2014).

3.6. Toxicidad

Se observa un gran número de artículos que estudian la toxicidad de los almizcles nitro, en muchas mayores proporciones que para el tonalide y galaxolide.

Los estudios de laboratorio sobre nitroalmizcles se han centrado principalmente en tres áreas principales: efectos de desarrollo debido a la exposición perinatal y la primera infancia, los efectos endocrinos, y los efectos cancerígenos (Taylor et al., 2014).

Los estudios de efectos sobre el desarrollo se han centrado en los resultados del parto a través de especies, tales como la capacidad de concebir y de la viabilidad de los embriones, y se han encontrado resultados contradictorios. La exposición de ratas preñadas a 45 mg/kg/día de almizcle cetona o 200 mg/kg/día de almizcle xileno, no ha demostrado tener ningún efecto adverso sobre el embrión (Christian et al., 1999). En el pez cebra, se

encontró almizcle cetona entre 0,1 y 10 mg/g de alimento/día para reducir el peso corporal de las hembras de desove hasta 38% y reducir el número de huevos / hembra / día hasta 95% (Carlsson et al., 2000). Los embriones que fueron expuestos a almizcle cetona en niveles superiores a 10 mg/L en el agua circundante habían disminuido la supervivencia en la etapa de la vida temprana (Chou et al., 1999). Cuando los embriones de ranas de Sudáfrica fueron expuestas a 400 mg/l/día de cualquiera de los almizcle en el agua circundante durante 11 días, no hubo aumento de la mortalidad de larvas (Gregoraszcuk et al., 2009).

La preocupación sobre los posibles efectos endocrinos surgió cuando se reconoció la lipofilia de los almizcles nitro . Esto es debido a que muchos compuestos aromáticos similares lipófilos han demostrado tener capacidades de unión a los receptores endocrinos (Mullerova y Kopecky, 2007). Uno de los primeros estudios, se centro en la investigación de los posibles efectos sobre el sistema endocrino, investigando la capacidad de unión de los almizcles xileno, cetona, muscado y sus derivados a los receptores de estrógeno de truchas y ranas. No observándose ninguna unión de los almizcles indicados a los receptores de estrógenos en estas especies.

Bitsch et al. (2002), llevó a cabo un ensayo de pantalla E para detectar la actividad estrogénica, utilizando células humanas de cáncer de mamas, que estuvieron expuestas a 10 mmol/L de almizcles xileno/cetona o 5 mmol/L de otros derivados. La actividad estrogénica fue confirmada, por un incremento significativo en la proliferación de células cancerosas en un 29% debido al efecto del almizcle xileno, en un 97% por el almizcle cetona y un 29% debido a un compuesto derivado de ellos. Este aumento de la proliferación fue erradicada cuando se añadieron los almizcles en presencia de 1 $\mu\text{mol/L}$ de tamoxifeno (un receptor de estrógenos), lo que indica que los efectos de los almizcles fueron eliminados.

El aumento de la preocupación por los posibles efectos cancerígenos de almizcles nitro fue iniciado por un estudio de Maekawa et al. (1990), que encontró que los ratones alimentados con comida que contenía 0,075% o

0,15% almizcle xileno tenían hasta tres veces más tumores sobre la inspección post-mortem de los ratones de control. Los estudios de carcinogenicidad después del estudio Maekawa se centraron en examinar si estos productos químicos fueron genotóxico. Múltiples estudios utilizando diferentes pruebas de genotoxicidad en ratas indicaron que no eran los nitro almizcles genotóxico (Kevekordes et al., 1996; Kevekordes et al., 1997; Api et al., 2000). Estos resultados implican que había otros procesos que ocurren in vivo para promover la génesis tumoral. Una posible vía para explicar este aumento en la génesis del tumor después de la exposición a los almizcles nitro es que podría ser un resultado de nitro almizcles interaccionando con otras toxinas para aumentar la potencia de genotóxicos conocidos (Mersch-Sundermann et al., 1996). Otra vía para la promoción de la génesis tumoral fue propuesto por Luckenbach y Epel (2005), que encontraron que el almizcle xileno y cetona podrían inhibir la eficacia de múltiples fármacos transportadores de eflujo en mejillones marinos.

3.7. Niveles de concentración encontrados en aguas

Las fragancias se consideran microcontaminates, debido a que se encuentran en baja concentración en aguas. Se van acumulando en: suelos, aguas residuales, ríos, playas, lagos y sedimentos. Las mayores concentraciones se han encontrado en efluentes, disminuyendo a medida que pasa por la planta de tratamiento de residuos, y en los campos tratadas con este tipo de aguas. Esta información es crítica para poder evaluarlos como alteradores endocrinos (Chase et al., 2012).

En la siguiente tabla I.1. se resumen algunos de los datos encontrados en la bibliografía para diferentes tipos de muestras de aguas como son: agua de mar, rio, lago, afluente y efluentes. El consumo de los productos perfumado ha aumentado durante el paso de los años y sus residuos en las aguas también en concordancia.

Tabla I.1: Concentraciones de fragancias en aguas superficiales en ng/L.

Procedencia	Tipo de muestra	HHCb (ppt)	AHTN (ppt)	MX (ppt)	Mk (ppt)	Referencia
Alemania	Agua de río	36-152	24-88	*	2-10	Winkler et al. ,1998
Japón	Agua de río	0,7-100	*	4,1	9,9	Yun et al., 1994
UK	Agua de río	*	*	2	3-7	Simonich et al., 2002
España	Agua de río	44-1861	12-194	10-23	15-40	Gómez et al, 2009
Mar del norte	Agua mar	0,09-0,088	0,09-0,94	*	*	Bester et al.,1998
USA	Agua lago	4,7	1	0,049	0,081	Peck et al., 2004
Alemania	Efluente	600-2000	800-2400	30-310	220-1300	Eschke et al., 1994
Holanda	Efluente	1600	700	*	*	Artola, 2002
Austria	Efluente	*	*	<10	38-53	Hohenblum et al.,2000
UK	Efluente	1000-4600	600-2700	40-200	10-170	Simonich et al., 2002
USA	Efluente	56,9	34	1,1	27,4	Osemwengic et al.,2004
China	Efluente	297-2300	86-717	*	80-743	Zeng et al.,2005; 2007
España	Efluente	1259-8697	156-981	59-203	34-218	Gómez et al, 2009
Canadá y Suecia	Efluente	157-1300	42-520	<1	<1	Ricking et al, 2003
Texas	Afluente	4772-13399	509-2337	ND	ND-812	Chase et al., 2012

En la tabla I.1, se puede ver que galaxolide es el compuesto encontrado en mayores concentraciones, seguido por el tonalide, los dos almizcles policíclicos. Los nitroalmizcles se encuentran en concentraciones mucho menores. Las concentraciones encontradas son muy bajas sobre todo para agua de mar y lagos.

En los estudios de agua de río, se encontró una relación proporcional entre la concentración y la distancia que existe entre el lugar de toma de muestra y la EDAR, así como del caudal y el factor de dilución del río (Simonich et al., 2002). Las concentraciones máximas de estos compuestos en los efluente de las planta de tratamiento de aguas residuales pueden llegar a ng/ml, esto da una idea de la contaminación potencial de estos compuestos emergentes.

En cuanto a la relación de concentraciones entre HHCB y AHTN, es relevante el hecho de que se encuentran en el mismo orden de magnitud, teniendo en cuenta que el consumo de galaxolide es tres veces superior al de tonalide, estas diferencias pueden deberse a diferencias en su comportamiento ambiental de ambas fragancias.

3.8. Fragancias en procesos de depuración de aguas residuales urbanas

Un gran número de micro-contaminantes orgánicos persistentes, como los productos farmacéuticos, pesticidas y productos de cuidado personal, se han encontrado en agua residuales de efluentes en todo el mundo. Esto demuestra que tecnologías de tratamiento convencionales son ineficaces en la eliminación de estos compuestos de aguas residuales (Halling-Sørensen et al., 1998; Ternes, 1998; Kolpin et al., 2002).

3.8.1. Tecnología de depuración de aguas residuales urbanas

En las EDAR, los procesos de depuración de aguas se clasifican en pretratamientos, tratamientos primarios y secundarios. En algunas de ellas presentan también tratamientos terciarios aunque no es lo habitual. Un esquema de los diferentes proceso se puede observar en la tabla I.2.

Tabla I.2: Clasificación de tecnología aplicables

TECNOLOGÍAS APLICABLES	
PRETRATAMIENTOS	
Desbaste	
Desarenado	
Desengrasado	
TRATAMIENTOS PRIMARIOS	
Fosas sépticas	
Tanques Imhoff	
Decantación primarias	
TRATAMIENTOS SECUNDARIOS - TECNOLOGÍAS EXTENSIVAS	
Lagunajes	
Humedales artificiales	Humedal artificial de flujo horizontal
	Humedal artificial subsuperficial de flujo horizontal
	Humedal artificial subsuperficial de flujo vertical
	Humedal artificial de macrófitos en flotación
Filtros intermitentes de arena	
Infiltración-percolación	
TRATAMIENTOS SECUNDARIOS - TECNOLOGÍAS INTENSIVAS	
Aireaciones prolongadas	
Lechos bacterianos	
Contactores biológicos rotativos	
Reactores secuenciales	

En la bibliografía se han encontrado diferentes autores que estudian la eliminación de almizcles en diferentes tratamiento de agua primario, secundario y terciario.

3.8.1.1. Tratamiento primario

La coagulación-floculación y los procesos de flotación se evaluaron para el pre-tratamiento de aguas residuales de hospitales, para la eliminación de 13 productos de atención farmacéutica y personal (PPCP) (Suarez et al., 2009). Para la coagulación-floculación, los ensayos se realizaron en un dispositivo de

Jar-Test y en continuo a escala planta piloto. Las aguas residuales crudas del hospital, así como el efluente de la planta de coagulación continua, fueron tratadas en una celda de flotación. La eliminación de sólidos suspendidos totales durante el pre-tratamiento fue muy efectivo, alcanzando una eficiencia promedio de reducción del 92% en combinación del proceso de coagulación-flotación. Las fragancias fueron eliminadas en un alto grado durante lotes de coagulación-floculación (tonalide: $83,4 \pm 14,3\%$; galaxolide: $79,2 \pm 9,9\%$; Celestolide: $77,7 \pm 16,8\%$), presumiblemente debido a su fuerte carácter lipofílico que promueve la interacción de estos compuestos con la fracción lipídica de los sólidos. La flotación de aguas residuales crudas condujo a resultados ligeramente peores en comparación con la coagulación-floculación. En cuanto a la eliminación de los PCP, las eficiencias más altas han sido medidas para las fragancias HHCB, AHTN y ADBI ($> 90\%$) que se atribuyó a su carácter lipófilo fuerte que facilita su eliminación por absorción. Esto explica también el hecho de que los resultados mejoraron en corrientes que tenían mayor contenido en grasas.

3.8.1.2. Tratamientos secundarios

A. Tecnologías Extensivos

Las técnicas extensivas son procesos que realizan la depuración mediante cultivos fijos sobre soporte fino o incluso mediante cultivos libres pero que utilizan la energía solar para producir oxígeno mediante fotosíntesis. El funcionamiento de este tipo de instalaciones sin electricidad es posible, excepto para el lagunaje aireado para el cual una aportación de energía es necesaria para alimentar los aireadores o los materiales de insuflación de aire.

En los procesos con microalgas, un estudio ha demostrado que los sistemas de tratamiento de aguas residuales a base de microalgas permiten la extracción de una amplia gama de contaminantes emergentes de las aguas residuales urbanas. La eficiencia de eliminación del 60% al 90%: galaxolide y tonalide (Matamoros et al., 2015).

En los tratamiento con humedales, se evaluó su eliminación en una planta piloto híbrida que consta de un flujo ascendente de lodo en un reactor anaeróbico, seguido por dos flujo conectado horizontalmente construidos por humedales: el primero un humedal de flujo superficial y por último un humedal de flujo subsuperficial. En la fase disuelta, la eficacia de eliminación global en el verano fue de 70% a 85%, mientras que en invierno se redujo para la mayoría de los productos de higiene personal entre 30% y 50%. En los sólidos suspendidos, la eliminación supera el 80% para la mayoría de los compuestos diana, no observándose grandes variaciones por estacionalidad (Reyes et al., 2011). También hay estudios sobre la eficacia de los humedales artificiales que son superior en verano que en invierno, para algunos contaminantes emergentes (ibuprofeno, carbamazepina y clofíbrico) entre ellos las fragancias (Dordio et al., 2010).

Investigaciones sobre modelos de regresión múltiples para la eliminación de materia orgánica y productos de higiene personal, mediante humedales artificiales para el tratamiento de aguas residuales, indican que la fragancia tonalide, se elimina con mayor facilidad en un rango de pH neutro, debido a que se optimizan los valores para la nitrificación y producción heterotrófica de los humedales artificiales (Hijosa et al., 2011; Truu et al., 2009).

B. Tecnologías intensivas

Las técnicas más desarrolladas en las plantas de depuración urbanas son las basadas en procesos biológicos intensivos. El principio de estos procesos es localizar sobre superficies reducidas e intensificar los fenómenos de transformación y destrucción de las materias orgánicas que se pueden observar en la naturaleza.

B1. Fragancias en lodos

Estudio del contenido de fragancias en aguas residuales en 14 plantas de tratamiento de aguas. Donde la mayoría de las fragancias se quedan

retenidas en los lodos. EL AHTN Y HHCB, son los predominantes en aguas, procedentes en su mayoría de los hogares, más que de la industria. Durante el proceso de separación de lodos se elimina en ellos la mayor parte de las fragancias. Con la consecuencia de que estos lodos se reutilizan para la agricultura y estos compuestos vuelven a las aguas a través de los riegos, la lluvia y las infiltraciones del terreno a las aguas subterráneas (Clara, et al. 2011).

La eliminación parcial observada para las fragancias Tonalide y Galaxolide, durante el tratamiento de aguas residuales es principalmente debido a la adsorción en lodo y no por transformaciones biológicas según Jossa et al. 2005.

Los valores medios en lodos procedentes de 16 plantas de tratamiento de aguas residuales en Suiza, 20,3 mg/kg para HHCB, 7,3 mg/kg de AHTN y 1,8 mg/kg para HHCB-lactona, respectivamente (Kupper et al., 2004). La tecnología de tratamiento de aguas residuales y el tratamiento de lodos parece tener menor eficacia para los procesos de degradación de los almizcles policíclicos.

Los lodos en Alemania contenían 3000 ng/g de HHCB y 1500 ng/g de AHTN. Alrededor del 35% de ambos compuestos pasa a través de la planta sin alteraciones, llegando al río. Entre un 5-10% de la HHCB se oxidó en la planta en HHCB-lactona (Bester, 2004).

En Canadá son tres o cuatro veces mayores que en aguas residuales, se detecta que en épocas del año más frías disminuye la concentración de estos compuestos. En un campo agrícola enmendado con biosólidos de este EDAR, se detectaron HHCB y AHTN en el suelo inmediatamente después de la aplicación, en concentraciones medias de 1,0 y 1,3 $\mu\text{g} / \text{kg}$, respectivamente, pero las concentraciones disminuyeron de forma relativamente rápida en el paso de 6 semanas después de la aplicación (Yang et al., 2006).

Las concentraciones de AHTN y HHCB liberado de los EDAR municipales, se encuentran en niveles bajos mg/L y representan un riesgo

insignificante para comunidades biológicas aguas abajo de EDAR en los EE.UU (Sun et al., 2014; Federle et al., 2014).

Las tasas de extracción de almizcles policíclicos en Suiza, oscilaron entre 72% a 86%, la eliminación de aguas residuales durante el tratamiento fue impulsado principalmente por la adsorción de sólidos y la biodegradación (Kupper et al., 2006).

Estudios mediante una unidad convencional de lodos activados y un manto de lodo anaerobio con reactor de flujo ascendente. La mayoría de los productos de higiene personal se degradan más fácilmente bajo condiciones aeróbicas. La degradación es dependiente de la actividad nitrificante en la unidad convencional de lodos activados y la actividad metanogénica en el reactor de flujo ascendente. La sorción sólo fue significativa en el reactor de flujo ascendente para la eliminación de compuestos lipófilos. En condiciones anaerobias, el aumento en la velocidad ascendente y el tiempo de retención hidráulico mejoran la sorción y por lo tanto la eliminación de compuestos lipófilos. El grado de influencia siguió la tendencia de degradación AHTN> ADBI> HHCB (Alvarino et al., 2014).

B2.Tratamiento con bioreactores

Un bioreactor de membrana (Reif et al., 2008), se ha estudiado en el tratamiento aguas residuales sintéticas. Estos microcontaminantes se añadieron a las aguas residuales sintética para alimentar al reactor en el medio ambiente en concentraciones correspondientes entre 10 y 20 µg / L. Teniendo en cuenta las investigaciones anteriores, el bioreactor de membrana se hace funcionar a un tiempo de retención de lodos de 44-72 días, un valor alto de este parámetro es considerado como crucial para la eliminación de estos microcontaminantes. Bajo estas condiciones, se observan diferentes destinos dependiendo si son productos de atención farmacéutica y personal (PPCP). Las sustancias orgánicas hidrofóbicas, como los almizcles, se incorpora parcialmente a los lodos. Esto explica la eliminación parcial observada en el reactor, con una eficiencia general alrededor de 50%.

Para el estudio del comportamiento complejo de los almizcles sintéticos durante el proceso de tratamiento de aguas residuales en bioreactores, se eligieron cuatro almizcles sintéticos, galaxolide (HHCB), tonalide (AHTN), el almizcle xileno (MX) y cetona (MK) en una planta de tratamiento de Shanghai, China (Yan et al., 2010), durante las cuatro estaciones del año. Los resultados mostraron que la temperatura de funcionamiento más alta favorece la eliminación de los almizcles sintéticos. La pérdida de la masa total de los almizcles sintéticos durante el proceso de tratamiento de aguas residuales eran de 131,7 g/día (28,3 g/día perdidos en el biorreactor) en verano, seguido por 109,1 g/día (29,8 g/día perdidos en biorreactor) en el otoño. La eliminación en el biorreactor fue fluctuando con las estaciones.

Estudios en un biorreactor de membrana en escala piloto (Claraa et al., 2005), se hizo funcionar a diferentes tiempos de retención y los resultados obtenidos se comparan con las plantas de lodos activados operado en diferentes tiempo de retención. Concluyen, que la membrana de ultrafiltración de accionamiento no permite cualquier retención adicional de las sustancias investigadas debido a la exclusión de tamaño. Las ósmosis inversa y / o nanofiltración sería necesaria para detener las sustancias investigadas, lo que añadiría aún más consumo de energía al biorreactor.

3.8.1.3. Tratamiento terciario con ozono

El ozono elimina contaminantes orgánicos, ya sea por reacción directa, o a través de la formación de radicales hidroxilo que puede entonces reaccionar con las moléculas diana. La mineralización completa de compuestos persistentes no es siempre económicamente factible. Se estudio la reacción de las distintas fragancias en aguas residuales, al aplicar procesos de ozono. Se observa que la reacción de eliminación para HHCB y AHTN transcurre lentamente, mientras que para MX y MK no se produce ningún tipo de reacción (Janzen et al., 2011).

En Alemania se llevaron a cabo tratamientos con ozono (5-15 mg/L) para la eliminación de fármacos, fragancias, etc. en agua residuales a través de procedimientos de oxidación avanzados como son: ozono/ agua oxigenada y ozono/ ultravioleta-visible. Obteniéndose que las fragancias Tonalide y Galaxolide, no se detentaron después del tratamiento, cuando se partía de valores de concentración en mg/L (Ternes et al., 2003).

3.8.2. Niveles de almizcles en EDAR

Las fragancias sintéticas se comenzaron a identificar en muestras medioambientales hace casi 30 años. El galaxolide y tonalide fueron detectada con más frecuencia de los almizcles policíclicos y en los más alto niveles de concentración. Las concentraciones en los efluentes oscilaron entre 1.8 a 9 mg / L para galaxolide y de 0,1 a 0,9 mg / L para tonalide. Almizcle cetona y el almizcle xileno fueron sólo ocasionalmente detectados en muestras analizadas, pero a niveles de concentración más bajos que los almizcles policíclicos, alrededor de 100 ng / L en aguas tratadas. En 1981, Yamagishi, obtuvieron concentraciones en los efluentes de Japón comparables con los obtenidos en 2012, varió entre 25 a 36 ng / L para el almizcle de xileno y de 140- 410 ng / L para almizcle de cetona (Martínez et al., 2012). Estos almizcles son preocupantes debido a su carácter lipófilo, por lo que tienden a acumularse en sedimentos, lodos y la biota.

En estudio de fragancias policíclicas en diferentes plantas de tratamiento de aguas en Canadá y Suecia se observo que las muestras de Canadá estaban 10 veces más contaminadas en todas las muestras para HHCB y AHTN (Ricking et al., 2003).

En aguas residuales y lodos de una planta de tratamiento alemana, las concentraciones del afluyente estaban en 1900 ng/L de HHCB y 580 ng/L de AHTN (Bester, 2004). En los afluentes del río Lippe (Dsikowitzky et al., 2004), y en la cuenca del río Ruhr (Kai et al., 2008), se detectaron concentraciones de AHTN y HHCB entre 30-100 ng/L También se detectaron altas concentraciones

en estaciones depuradoras (Bosnia, Croacia y Serbia) (Terzica et al., 2008), donde el galaxolide fue el más abundante con niveles promedio de 630 ng/L, junto con el tonalide (Mitjans y Ventura, 2005).

También se han obtenidos resultados en España (Martínez et al., 2012), durante casi dos años en un programa de monitoreo llevado a cabo en cinco plantas municipales de tratamiento de aguas residuales ubicadas en el norte (Cantabria, Barcelona), centro (Madrid) y sur-este (Almería). Los principales compuestos persistentes fueron detectados en efluentes, de los cuales hidroclorotiazida, atenolol, gemfibrozilo, galaxolide y tres metabolitos (ácido fenofíbrico, 4-AAA y 4-FAA), presentan los porcentajes promedios más altos, en relación con la carga total de contaminantes de los efluentes en la planta de tratamiento.

Yamagishi et al.(1983), encontraron su presencia en más del 80% de las muestras de agua del río y aguas residuales tomadas desde múltiples estaciones de muestreo en el río de Tama y de la bahía de Tokio. Desde entonces almizcles nitro se han encontrado en los ambientes marinos y biota del Mar Báltico, el Mar del Norte, el río Moldava en Praga, y el lago Michigan en los EE.UU. (Rimkus, 1995; Peck y Hornbuckle, 2004; Hajkova et al., 2007). Esta observación sugiere que son contaminantes típicos de aguas residuales.

3.8.3. Eliminación de almizcles en EDAR

Los almizcles sintéticos entran en las plantas de tratamiento de aguas residuales domésticas (EDAR) a través de las descargas en los sistemas de alcantarillado municipales. Las muestras de aguas residuales acuosas y biosólidos obtenida de la planta de tratamiento de aguas residuales de Ontario, (Canadá) donde se analizaron 11 almizcle sintético. Los resultados mostraron que HHCB y AHTN son las fragancias dominantes en las aguas residuales, pero otros almizcles policíclicos y los almizcles nitro estuvieron presentes en concentraciones más bajas. Las concentraciones de HHCB y AHTN en la fase acuosa de las aguas residuales están altamente correlacionadas con DBO₅ y

COT. La eficacia de eliminación total de almizcles sintéticos de las aguas residuales acuosa en la depuradora varió de 43,3% a 56,9%, pero la eliminación se produjo principalmente por la partición en los biosólidos, basado en un modelo de balance de masa, la entrada y salida diaria (Yang et al., 2016).

Carballa et al. (2004), explicaron la alta velocidad de eliminación de estos almizcles debido a la adsorción y los fenómenos de biodegradación. Las eficiencias de absorción son de entre 70 y 85% para galaxolide y 75-90% para tonalide (Villa et al., 2012). Sin embargo, las plantas de tratamiento de aguas residuales sólo degradan entre 46-54% de los almizcles nitro que entran en la planta antes de la liberación de nuevo en sus efluentes (Wang et al., 2011). Por lo tanto, incluso con tal tratamiento, el potencial para la exposición ambiental permanece. Además, los productos de biotransformación de almizcles nitro creados por el proceso de tratamiento de aguas residuales también podrían ser de interés en la evaluación de riesgos (Yamagishi et al., 1983; Peck y Hornbuckle, 2004; Peck y Hornbuckle, 2006).

La cantidad de contaminantes presentes en las aguas, que no han sido totalmente eliminados y que se vierten o se reutilizan, van produciendo efectos de preconcentración en las misma. Estos es indicado por diferentes autores: Herberer et al. (1999), encontraron que algunos contaminantes orgánicos se detectaban en el agua del grifo, correlacionando sus concentraciones con los niveles de agua superficiales filtradas y por la reposición de aguas subterráneas de Berlín. Esto plantea la preocupación del aumento de almizcles y otros contaminantes estables del medio ambiente acuático, que podrían pasar al agua potable. La evidencia sugiere que las áreas que utilizan sistemas de reposición de agua de bucle cerrado o semi-cerrado, verán un aumento gradual de la concentración de contaminante en el tiempo. Este efecto es el resultado del flujo de aguas subterráneas y el aumento de los efluentes de aguas residuales que se añade a las aguas superficiales (Reemtsma et al., 2006).

Se han desarrollado estudios sobre la eficacia de eliminación de contaminantes emergentes a su paso por tratamiento concreto de eliminación de aguas residuales como, se detalla en los siguientes subapartados. Con la finalidad de aumentar la eficacia de las EDAR.

4. Metodología analítica para la determinación de fragancias en aguas

4.1. Introducción

En los últimos años se han ido introduciendo muchos requisitos legislativos que implican una adaptación de las capacidades analíticas. No sólo se ha producido un incremento en frecuencia de análisis, sino también se incrementó el número de compuestos orgánicos a determinar en las aguas.

Esto está obligando a los laboratorios a adecuar continuamente su capacidad analítica introduciendo nuevas metodologías en sus análisis rutinarios y mejorando sus estrategias de análisis. Especialmente, el análisis de nuevas sustancias emergentes como las fragancias se presenta como uno de los retos más importantes.

Estas mejoras están basadas en los siguientes aspectos:

1. Desarrollo de nuevos procesos de preparación de muestras.
2. Inversión en nuevos equipamientos de análisis y en la formación de expertos.
3. Incorporación de herramientas de control de calidad.
4. Incorporación de nuevas técnicas de toma de muestras y análisis on line.

4.2. Antecedentes bibliográficos sobre metodologías analíticas

Antes del comienzo de la puesta a punto de la metodología analítica de esta tesis doctoral, se llevo a cabo una extensa búsqueda bibliográfica de la metodología existente en este siglo (tabla I.3 y I.4), hasta el comienzo de este trabajo en 2012. Teniendo en consideración tanto la parte de preparación de muestra como la instrumental. Se encontraron métodos que tenían alguno de los compuestos estudiados en esta tesis, aunque no un método específico para todos ellos. Las matrices de la bibliografía también difieren siendo más comunes en lodos y sedimentos. Los almizcles se han encontrado incluidos en algunos métodos donde el objetivo principal era el estudio de fármacos en agua como principales protagonistas.

En los antecedentes bibliográficos, se hace referencia al estudio de las siguientes fragancias (tabla I.3): Tonalide, Galaxolide, Cashmeran, Celestolide, Phantolide, Traseolide, Almizcles (xileno, cetona, ambreta, moskene, tibetene), Vainillina, Acetylcedreme, Menthylacetate, 4-Oxoisophorone, Helvetolide, Globalide, Romandolide, Thibetolide, Muscone, Ambrettolide, Ethylene Brassilate, Galaxolidone, Habanolide, Iso E super, Cyclopentadecanolide, Camphor, Menthol, Amberonne, 3-Methyl-1h-indole, Acentophenone, Isoborneal y Versalide. Cada uno aporta aromas diferentes a madera, menta, vainilla, floral, hormigón, a limpio, entre otros. De estas fragancias las que se usan en mayor cantidad, considerándose las fragancias estrellas son el Galaxolide y el Tonalide, las cuales también se encuentran en mayor concentración contaminando aguas, lodos y sedimentos. También son muy abundantes los nitro almizcles, por este motivo son los compuestos estudiados en esta tesis doctoral, el resto de los compuestos son inapreciables en el medioambiente.

Tabla I.3. Fragancias encontradas en los artículos (tabla I.4), sus iones característicos y límites de detección.

Fragancias	nº CAS	Técnica analítica	Iones padre	Iones hijos	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)
Tonalide	1506-02-01	CG/MS y CG/MS/MS	243; 258;	213;159	7	5
Galaxolide	1222-05-5	CG/MS y CG/MS/MS	243; 258;	213	6	80
HHCb-lactona	96-48-0	CG/MS	257; 272;	*	10	*
Cashmeran	33704-61-9	CG/MS	191; 206; 192; 163;	*	*	20
Celestolide	13171-00-1	CG/MS	229; 244; 173;	*	*	20
Phantolide	15323-35-0	CG/MS	229; 244; 187; 230;	*	*	5
Traseolide	68140-48-7	CG/MS	215; 173; 258;	*	5	20
Musk xylene	81-15-2	CG/MS	282; 297; 283; 263;	*	9; 19;	63
Musk ketone	81-14-1	CG/MS	279; 294; 280;	*	7	20
Musk ambrette	83-66-9	CG/MS	253; 268; 254;	*	33	80-109
Musk Tibetene	145-39-1	CG/MS	251; 266;	*	4	80
Musk mosken	116-66-5	CG/MS	263; 278; 264; 279;	*	6	19
Helvetolide	141773-73-1	CG/MS	129	*	*	10
Globalide	34902-57-3	CG/MS	238, 68;	*	*	80
Romandolide	236391-76-7	CG/MS	55; 24;	*	*	40
thibetolide	106-02-5	CG/MS	180; 138;	*	*	80
ambrettolide	7779-50-2	CG/MS	67; 81; 252;	*	*	80
Ethylene brassilate	105-95-3	CG/MS	227; 98;	*	*	20
Butylated hydroxytoluene	128-37-0	CG/MS y CG/MS/MS	205; 220; 177; 205; 220;	177; 205;	*	*
Camphor	76-22-2	CG/MS/MS	95; 108;	67; 93;	*	*
Menthol	89-78-1	CG/MS/MS	95; 123;	67; 81;	*	*
Vanillin	121-33-5	CG/MS/MS	151	108; 123	*	*
Acetylcedrene	80449-58-7	CG/MS	*	*	5	*

Tabla I.4. Antecedentes bibliográficos sobre metodología analíticas.

ARTICULOS	PREPARACIÓN DE MUESTRA	CONDICIONES DEL ANALISIS POR CROMATOGRÁFIA DE GASES			
		INYECCIÓN	COLUMNA	DETECTOR	MODO
VILLA ET AL., 2012	SPE (HLB)	SPLITLESS	RXI-5SIL (30x0,25x0,25)	CG-MS	SIM
POSADA ET AL., 2012	MASE	SPLITLESS	HP5MS (30X0,25X0,25)	CG-MS	FULL SCAN 50-525 uma
MARTINEZ ET AL., 2012	EXTRACCIÓN LIQ-LIQ		HP-5HSI (15X025X025)	CG-MS	
REYES ET AL., 2011	SPE (PHENOMENA)	SPLITLESS (30 SG SPLIT)	TRB-5MS (30X0,25X0,25)	CG-MS	FULL SCAN 50-500
JANZEN ET AL., 2011	SPE COLUMN STRATA-X	SPLITLESS/ SPLIT 20	DB-5MS (15x0.25x0.25)	CG-MS	FULL SCAN (50–400 U)/SIM
CLARAA ET AL., 2011	EXTRACCIÓN LIQ-LIQ		DB-5 (60x0.25x0.25)	CG-MS	
LOPEZ ET AL., 2011	DLLME	SPLITLESS (60 SG)/SPLIT	HP5MS (30X0,25X0,25)	CG-MS	FULL SCAN 40-300 UMA/ SIM
SUAREZ ET AL., 2009	SPE/SPME				
GOMEZA ET AL., 2009	EXTRACCIÓN LIQ-LIQ		HP-5HSI (15X025X025)	CG-MS	
BESTER ET AL., 2008 (2)	EXTRACCIÓN LIQ-LIQ	PTV SPLITLESS	DB-5MS (15x0.25x0.25)	CG-MS	SIM
REIF ET AL., 2008	SPE	SPLITLESS (30 SG SPLIT)	BP-5(30X0,25X0,25)	CG-MS	
BESTER ET AL., 2008 (1)	EXTRACCIÓN LIQ-LIQ		DB-5MS (15x0.25x0.25)	CG-MS	SIM
TERNES ET AL., 2007	SPE-C18 500MG	SPLITLESS	XTI-5(30X0,25X0,25)	CG-MS	
KUPPER ET AL., 2006	EXTRACCIÓN LIQ-LIQ	SPLITLESS	DB-5MS (50X0,2X0,33)	CG-MS	
CLARAA ET AL., 2005	SPE (RP-18)			GC (ESI)MS	
BESTER., 2004	EXTRACCIÓN LIQ-LIQ	PTV SPLITLESS			SIM
DSIKOWITZKY ETAL., 2004	EXTRACCIÓN LIQ-LIQ	SPLITLESS (60 SG)/SPLIT	BPX-5 (30x0,25x0,25)	CG-FID (300 ^a c) /CG-MS	
RICKING ET AL., 2003	SPE	SPLITLESS (60 SG SPLIT)	DBXLB (60X0,25X0,25) Ó BPX5	CG-MS	SIM
	EXTRACCIÓN LIQ-LIQ	SPLITLESS (60 SG SPLIT)	BPX5 (30X0,25X0,25)	CG-MS	FULL SCAN 50-500
CHASE ET AL., 2012	SPE C18/ SBSE	SPLITLESS	DB-5 (30x0,25x0,25)	CG-MS	
ARBULU ET AL., 2011	SBSE		HP5MS (30X0,25X0,25)	CG-MS	SIM
TEIJON ET AL., 2010	EXTRACCIÓN LIQ-LIQ			CG (no detalles)	
BESTER., 2009			DB-5		
TRENHOLM ET AL., 2008	SPE (HLB)	SPLITLESS CON FRITADA	DB-5MS (30x0,25x0,25)	CG-MS-MS	MS-MS
YANG AND METCALFE., 2006	EXTRACCIÓN LIQ-LIQ	0,75 MIN SPLITLESS	VF-5MS (30x0,25x0,25)	CG-MS	

ARTICULOS	PREPARACIÓN DE MUESTRA	CONDICIONES DEL ANALISIS POR CROMATOGRÁFIA DE GASES			
		INYECCIÓN	COLUMNA	DETECTOR	MODO
DUEDAHL ET AL., 2005	NO PARA AGUAS	SPLITLESS	HP-5	CG-MS	SIM
TERNESA ET AL., 2004	EXTRACCIÓN LIQ-LIQ		HT-8 (50)	CG-MS	
TERNESA ET AL., 2003	SPME	SPLITLESS	XTI-5(30X0,25X0,25)	CG-MS	
OSEMWENGIEAET AL., 2001	SPE	SPLITLESS (60 SG SPLIT)	HP-5MS (30X0,25X0,25)	GC-EI-MS	FULL SCAN 35-400

SPE: Extracción en fase sólida.

SPME: Microextracción en fase sólida.

LIQ: Líquido.

MASE: Extracción de disolventes asistida por membrana.

DLLME Microextracción líquido líquido dispersiva.

SBSE: Barras magnéticas de adsorción- extracción.

CG: Cromatografía de gases.

MS: Detector de espectrometría de masas.

MS-MS: Detector de espectrometría de masas/masas.

GC-EI-MS: Cromatografía de gases -Impacto electrónico- detector de masas.

GC (ESI)MS: Cromatografía de gases -electro spray- detector de masas.

GC-FID: Cromatografía de gases con detector de ionización de llamas.

Full Scan: Barrido de masas.

SIM: Monitorización de iones seleccionados.

uma: Unidad de masa atómica

En la tabla I.3 y I.4, se hace referencia a la metodológica analítica encontrada en diferentes artículos, hay muchos más artículos en los que se hace referencia a las fragancias como se puede observar en la bibliografía expuesta anteriormente, pero en la mayoría de los casos no hace referencia al método de análisis, sino que hacen referencias a algunos de los artículos que aparecen en la tabla I.8, como método de referencia utilizado. También en algunos artículos la metodología utilizada es para un grupo de compuestos muy grande, donde las fragancias, que lo componen son una minoría, estando el método optimizado para otros contaminantes emergentes.

Se han destacado en la tabla I.3. la mayoría de las fragancias encontradas en los diferentes artículos con su número CAS, que es muy útil, debido a que a este tipo de compuestos se les denomina normalmente por el o los nombres comunes por los que son conocidos, siendo difícil conocer su estructura y composición a través de esos nombres.

Los diferentes tipos de fragancias, que han sido estudiadas tienen como denominador común que todas se han sido analizadas por cromatografía de gases y en su mayoría por detectores de espectrometría de masas, aunque solo unas pocas con triplecuadrupolo que son equipos más caros y menos accesible para la mayoría de los laboratorios de investigación. Se han extraído los iones que han considerados como característicos para cada uno de los compuestos, que pueden servir de referencia o comparación con los que se desarrollan en otros laboratorio, siendo en su mayoría los mismos para todos los equipos, aunque se pueden detectar pequeñas diferencias, debido al voltaje aplicado de ruptura en cada etapa.

Los límites de detección y cuantificación calculados también se reflejan en la tabla I.3., todos ellos llegan a valores de ng/L, para todas las fragancias, pero llegan a estas concentraciones al multiplicar el factor de concentración realizado en el proceso de extracción líquido- líquido o en SPE, aunque las calibraciones en los diferentes equipos se realizan en µg/L, solo consiguiendo calibra en concentraciones más bajas utilizando SPME.

En la tabla I.4, se hace referencia a los métodos de extracción utilizados en cada artículo, siendo los más utilizados las más popularizadas en los laboratorios de rutina y con metodología de trabajo bien definida.

Al ser compuestos volátiles o semivolátiles que se encuentran en concentraciones muy bajas, se intenta por la mayoría de los autores que toda la muestra entre en columna, por eso el inyector esta en modo splitless.

En la mayoría de los centros de trabajo, cuando se propone la puesta a punto de un método, se suele partir del material e instrumentación de los que dispone antes de hacer una inversión en otros materiales. Por eso la coincidencia en el tipo de columna en la mayoría de los estudios, como es la compuesta por un (95%) Dimetil-(5%)difenilpolisiloxano, es la columna que usualmente viene por defectos con los equipos de cromatografía, por tener la característica de ser la más universal.

Por último comentar que los modos de análisis en espectrometría de masa más usados son Full Scan (un barrido en un rango de masas seleccionado) o SIM (la búsqueda de iones característicos de cada compuesto), este último tienen valores de sensibilidad mejores y los cromatogramas obtenidos son más limpios, presentando en consecuencia línea base inferiores.

En los apartados siguientes se trataran: la extracción de los analitos, las técnicas de determinación analítica y las matrices objeto de estudio.

4.3. Extracción de los analitos

En la parte de preparación de muestra habría que destacar como las más usadas la extracción líquido- líquido y la extracción en fase sólida.

A) Extracción Líquido-Líquido

Las extracciones recopiladas en la bibliografía se realizan con tolueno o con hexano, esta última es la más utilizada y descrita por los investigadores en los artículos citados en la tabla I.4, aunque difieren unos de otros en el volumen de hexano utilizado, en el número de separaciones, en la adición de NaCl, ajuste de pH, etc.

B) Extracción en fase sólida (SPE)

Las SPE, se realizan con variaciones de unos artículos a otros, cambiando los rellenos de extracción de los cartuchos de SPE, el acondicionamiento del cartucho en consecuencia, los disolventes de extracción, el volumen de partida de muestras y el volumen final de concentración, realizándose con rotavapor o pos corriente de nitrógeno.

C) Microextracción en fase sólida (SPME)

Este método de extracción resulta muy atractivo pues la extracción se realiza de manera rápida, y se lleva a cabo sin necesidad de utilizar disolventes. En los dos artículos de la bibliografía seleccionada se realiza mediante la técnica de espacio en cabeza, es decir, no sumergiendo la fibra en la muestra líquida (Ternesa et al., 2003 y Suarez et al., 2009).

D) Extracción por sorción sobre barra agitadora (SBSE).

La técnica de extracción por adsorción sobre barra agitadora (SBSE) (SBSE: siglas en ingles de Stir Bar Sorptive Extraction) o también conocida como Twister, parece una varilla de agitación magnética convencional, pero mientras se agitan las muestras, adsorbe y concentra los compuestos orgánicos en su revestimiento adsorbente de polidimetilsiloxano (PDMS). La varilla es posteriormente introducida en un equipo de desorción térmica para la extracción de los compuestos orgánicos retenidos (Arbulu et al., 2011 y Chase et al., 2012).

E) Extracción con disolventes asistida por membrana (MASE)

La extracción con disolventes asistida por membrana (siglas inglesas MASE), se basa en una extracción líquido-líquido pero a pequeña escala, en la cual se usa una membrana de polietileno de baja densidad (LDPE) para separar la muestra acuosa del disolvente orgánico. La MASE puede realizarse de forma completamente automatizada con el automuestreador multipropósito MPS e integrarse en el procedimiento de preparación de la muestra. Los extractos pueden inyectarse directamente en el GC o GC/MS en la modalidad de inyección de grandes volúmenes (LVI) (Posada et al., 2012).

F) Microextracción líquido-líquido por dispersión (DLLME)

La microextracción líquido-líquido por dispersión (siglas inglesas DLLME), es una técnica en la que una cantidad relativamente pequeña de un disolvente inmiscible en agua, se disuelve en un disolvente soluble en agua y se inyecta rápidamente con una jeringa en la muestra acuosa. La inyección rápida de la mezcla de disolventes orgánicos en el agua hace que el disolvente inmiscible en agua se disperse en la masa acuosa como pequeñas micro-gotas en las que se extraen los analitos de interés. La fase orgánica enriquecida se separa entonces de la muestra acuosa por centrifugación o congelación (dependiendo de su densidad) (López et al., 2011).

4.4. Técnicas de determinación analítica

La muestra una vez extraídas, se inyectan en un cromatografo de gases para la separación de los diferentes compuestos en la columna cromatográfica, utilizando diferentes rampas de temperatura. Esta parte es común en todos los trabajos seleccionados. El detector utilizado es un espectrómetro de masas, en la mayoría de los casos con un solo cuadrupolo, excepto en el trabajo de Trenholm et al. (2008), que trabajo con un triplecuadrupolo. Dsikowitzky et al. (2004), utilizaron además un detector de ionización de llamas (CG-FID), aunque los limites de detección en CG-FID son mayores.

4.5. Matrices estudiadas

4.5.1. Aguas superficiales

El agua superficial proviene de las precipitaciones, no se infiltra ni regresa a la atmósfera por evaporación o es también la que proviene de manantiales o nacimientos que se originan de las aguas subterráneas. Se encuentra circulando o en reposo sobre la superficie de la tierra. Estas masas de agua sobre la superficie de la tierra, forman ríos, lagos, lagunas, pantanos, charcas, humedales, y otros similares, sean naturales o artificiales. Las aguas superficiales pueden estar fluyendo constantemente como los ríos o estar en reposo como los lagos y lagunas.

4.5.2. Agua de mar

El agua de mar o agua salada es la solución que compone los océanos y mares de la Tierra. Es salada por la concentración de sales minerales disueltas que contiene, un 3,5% de media. Al desembocar los ríos principales en el mar, si estos llevan presente microcontaminantes, también pasaran al mar.

4.5.3. Aguas residuales urbanas

Las aguas residuales domésticas, son aguas procedentes de zonas de vivienda y de servicios, generadas principalmente por el metabolismo humano y las actividades domésticas (siempre estarán presentes en el ARU).

Como se ha indicado antes, una estación depuradora de aguas residuales (EDAR), tiene el objetivo genérico de conseguir, a partir de aguas residuales urbanas (ARU) y mediante diferentes procedimientos físicos, químicos y biotecnológicos, un agua efluente de mejores características de calidad y cantidad, tomando como base ciertos parámetros normalizados. Los

tratamientos se describieron en un apartado anterior y se resumen a continuación.

Pretratamiento: se utiliza para la eliminación de objetos gruesos, arenas y grasas. Constituido por las operaciones básicas de: Desbaste, tamizado, desarenado y desengrasado, se trata de procesos físicos.

Tratamiento primario: su objetivo es la eliminación de la materia sedimentable y flotante. Constituido por las operaciones básicas de: decantación primaria, tratamiento físico-químico (coagulación-flotación). Se trata de procedimientos físico-químico.

Tratamiento secundario: su objetivo es la eliminación de la materia orgánica disuelta o coloidal. Constituido por las operaciones básicas de: decantación secundaria, degradación bacteriana, se trata de procesos biológicos.

Tratamiento terciarios: su objetivo es la eliminación de sólidos en suspensión, materia orgánica residual, nutrientes y patógenos. Constituido por las operaciones básicas de: floculación, filtración, Eliminación de N y P, desinfección. Son procesos físicos, químicos y biológicos.

En general, las estaciones depuradoras de aguas residuales tratan agua residuales, procedente del consumo ciudadano en su mayor parte, así como del agua de lluvia, aguas residuales industriales y/o aguas pluviales.

Aguas residuales industriales: todas las aguas residuales vertidas desde locales utilizados para cualquier actividad comercial o industrial, que no sean aguas residuales domésticas ni aguas de escorrentía pluvial. Solo está permitido por las normas municipales el vertido a la red de saneamiento de aquellas aguas de origen industrial que no superen determinados valores. En caso contrario, deben tener un tratamiento previo.

Aguas pluviales: aquellas procedentes de la precipitación (tendrán influencia en las aglomeraciones con redes de saneamiento unitarias y en los momentos en que se registren lluvias).

4.6. Calidad en los análisis de laboratorio

La norma internacional UNE EN ISO/IEC 17025:2005, sobre requisitos generales para la competencia de laboratorios de ensayo, surgió como una guía genérica de referencia para aquellos laboratorios que realizan actividades de ensayo o calibración y que pretenden demostrar:

- Que operan en un sistema de gestión de la calidad eficaz y en mejora continua. Laboratorio que implementa un sistema de gestión de la calidad que le permite administrar y utilizar la documentación del laboratorio, tanto desde un punto de vista de gestión como técnico.
- Que son técnicamente competentes. En todos sus ámbitos: competencia técnica del personal, instalaciones y condiciones ambientales adecuadas, métodos validados, equipos calibrados y patrones certificados.
- Que son capaces de producir resultados de ensayo o calibración confiables, implementando programas de aseguramiento de la calidad de sus resultados y generando resultados técnicamente válidos.

La norma ISO/IEC 17025 es de aplicación para cualquier tipo de laboratorio de calibración o ensayos, independiente de su tamaño o actividad. Que deben cumplir una serie de requisitos agrupados en 25 apartados. Los primeros 15 apartados corresponden a los requisitos relativos a la gestión (administrativos) y se caracterizan por su gran similitud con normas de la serie ISO 9000. El resto contienen los requisitos que el laboratorio debe cumplir para demostrar su competencia técnica y asegurar la validez de sus resultados (tabla I.5).

La norma ISO/IEC 17025 se ha adoptado como guía de referencia de las Entidades Acreditadoras para ejecutar los procesos de evaluación de la conformidad de laboratorios de ensayo y calibración, por lo que es utilizada a nivel mundial para propósitos de Acreditación.

Tabla I.5. Requisitos de la normas ISO/IEC 17025.

Norma ISO/IEC 17025:2005	
Requisitos de gestión	Requisitos técnicos
4.1 Organización	5.1 Generalidades
4.2 Sistema de gestión	5.2 Personal
4.3 Control de los documentos	5.3 Instalaciones y condiciones ambientales
4.4 Revisión de los pedidos, ofertas y contratos	5.4 Métodos de ensayo y de calibración y validación de los métodos
4.5 Subcontratación de ensayos y de calibraciones	5.5 Equipos
4.6 Compras de servicios y de suministros	5.6 Trazabilidad de las mediciones
4.7 Servicios al cliente	5.7 Muestreo
4.8 Quejas	5.8 Manipulación de los ítems de ensayo o de calibración
4.9 Control de trabajos de ensayos o de calibraciones no conformes	5.9 Aseguramiento de la calidad de los resultados de ensayo y de calibración
4.10 Mejora	5.10 Informe de los resultados
4.11 Acciones correctivas	
4.12 Acciones preventivas	
4.13 Control de los registros	
4.14 Auditorías internas	
4.15 Revisiones por la dirección	

La Entidad Acreditadora es la encargada de evaluar la conformidad de cumplimiento de los requisitos de la norma ISO/IEC 17025 y atestiguar la competencia del laboratorio para realizar tareas específicas de ensayo (pruebas) o calibración, para en su momento declarar la acreditación.

Un laboratorio de ensayo o calibración que desea acreditarse bajo la norma internacional ISO/IEC 17025, o su equivalente nacional o regional, debe cumplir y mostrar evidencia del cumplimiento de los requisitos contenidos en las 25 apartados de la tabla anterior.

Estos requisitos contemplan la elaboración e implantación de:

- Un Manual de Calidad.
- Políticas de gestión y técnicas, incluidas una política de calidad.
- Procedimientos de gestión y técnicos.

Así como la generación de evidencia objetiva de su implantación:

- Registros de gestión y técnicos.

5. Normativa legal

5.1. Producción y uso de almizcles

El uso del almizcles ambreta fue prohibido en Europa en 1995, puesto que está confirmada su actuación como un potente foto-alérgeno y su inclusión en los productos cosméticos, puede representar un riesgo para la salud humana (Directiva 95/34/CE). Más tarde (1998) también se prohibió el uso de las almizcles moscano y tibetano debido a la toxicidad que podían generar a largo plazo (Directiva 98/62/CE).

La Comisión Europea clasificó la almizcle xileno como cancerígeno de categoría 3 (existen limitadas evidencias de poseer un efecto cancerígeno en el hombre, debido a que produce tumores en el hígado de ratones) y como compuesto muy tóxico para los organismos acuáticos, pudiendo producir efectos adversos a largo plazo en el medioambiente acuático (Comisión Europea, 2005). Por similitud estructural con almizcle xileno, almizcle cetona es clasificada del mismo modo aunque no existen estudios sobre su carcinogenicidad. Por estos motivos, la Directiva 2004/88/CE, relativa a los productos cosméticos, establece las restricciones que se muestran en la tabla I.6. Para establecer límites que tienen en cuenta la afirmación del comité científico de los productos cosméticos y de los productos no alimentarios (Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products, SCCNFP) de que las almizcles xileno y cetona pueden emplearse de modo seguro en los productos cosméticos, excepto para los productos de higiene bucal, hasta unas determinadas concentraciones máximas autorizadas de: 0,042 a 1,4% y 0,03 a 1,0% para almizcles cetona y xileno, respectivamente, dependiendo del producto cosmético (ninguno de ellos puede ser utilizado en forma oral), mientras que los almizcles ambreta, tibetano y muscado estaban prohibidas (Parlamento Europeo, 2009).

Tabla I.6. Restricciones de almizcle xileno y cetona.

Nombre	Nombre (inglés)	Número CAS	Ámbito de aplicación o utilización	Concentración máxima autorizada en el producto cosmético acabado
Almizcle de xileno	Musk xylene	81-15-2	Todos los productos cosméticos, excepto los productos para higiene bucal.	a) 1.0% en fragancia fina. b) 0.4% en agua de colonia. c) 0.03% en los demás productos.
Almizcle de cetona	Musk ketone	81-14-1		a) 1.4% en fragancia fina. b) 0.56% en agua de colonia. c) 0.042% en los demás productos.

Mientras que la concentración de almizcle xileno y cetona, su usos están regulados y deben ser eliminadas (Comisión Europea, 2002) los almizcles policíclicos, HHCB (galaxolide) y AHTN (tonalide) son utilizados como productos químicos de alto volumen incluido en la "cuarta lista de sustancias químicas de acción prioritaria " (Gatermann et al., 2002).

A parte de las restricciones impuestas en la Unión Europea, la Comisión de Oslo y París (OSPAR, 2004) incluye a la almizcle xileno en la lista de compuestos químicos para acción prioritaria (OSPAR, 2006). También contempla que la única solución para evitar la emisión de este contaminante es la eliminación de la almizcle xileno de los productos de consumo. En este informe se afirma que esta eliminación ya ha empezado y se considera que se debería continuar promocionando este proceso. Por otro lado, afirma que no se debe promover el uso de los almizcles policíclicos como sustitutos de las nitroalmizcles porque, aunque actualmente no se consideran sustancias persistentes y bioacumulativas, tienen características muy desfavorables.

Dos informes referidos a las dos almizcles policíclicos más abundantes, galaxolide y tonalide, (HERA, 2004) concluyen que no existe un riesgo significativo para la salud humana debido a la exposición por distintas vías a estos dos compuestos. Aunque, por otro lado, el Comité Científico sobre Productos Cosméticos y Productos No Alimentarios (SCCNFP) afirma que se debe restringir el uso de tonalide de modo que no se incorpore más de un 12% de la misma en las fragancias (SCCNFP/0609/02).

En 2008, bajo la autoridad del Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de Sustancias Químicas (REACH), el almizcle xileno fue clasificado como una sustancia de gran preocupación, muy bioacumulable y designado como muy persistente. Una advertencia de uso restringido se colocó en almizcle cetona. Ellos encontraron que los compuestos nitro almizcle no se degradan fácilmente, haciendo que sean altamente estable y ubicuo en el medio ambiente (Verbruggen et al., 2008).

Almizcles Nitro han sido sustituidos en gran medida por los almizcles policíclicos debido a la prohibición de estos compuestos en varios países (Villa et al., 2012; Wang et al., 2011). Sin embargo, los nitroalmizcles siguen siendo producidos en China y la India, también se utilizan en compuestos no cosméticos en los Estados Unidos que no han sido reformulados. Ante la persistencia en el medio ambiente y el uso continuado de nitro almizcles, incluso a nivel bajos, existe preocupación por los efectos de la exposición a largo plazo.

5.2. Normativa sobre calidad de aguas

La Directiva Marco del Agua (DMA) (Directiva 2000/60/CE) fue aprobada por la Unión Europea en diciembre del año 2000 y establece por primera vez un marco común a todos los países miembros, con el objetivo de alcanzar el buen estado ecológico de las masas de agua en el año 2015. Su objetivo es particularmente ambicioso: por un lado, prevenir el deterioro y mejorar el estado de los ecosistemas acuáticos y, por otro, promover el uso sostenible del agua.

La Ley de Aguas española (Ley 29/1985 de 2 de agosto) se modificó como consecuencia de la aprobación de la DMA y en 2001, se publica el Real Decreto Legislativo 1/2001 de 20 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Aguas,

La DMA define la contaminación del agua como “ La introducción directa o indirecta, como consecuencia de la actividad humana, de sustancias o calor

en la atmósfera, el agua o el suelo, que puedan ser perjudiciales para la salud humana o para la calidad de los ecosistemas acuáticos, o de los ecosistemas terrestres que dependen directamente de ecosistemas acuáticos, y que causen daños a los bienes naturales o deterioren o dificulten su disfrute y otros usos legítimos del medio ambiente”.

La DMA establece nuevos conceptos más amplios e integradores, tales como “Estado ecológico de las aguas” (“expresión de la calidad de la estructura y el funcionamiento de los ecosistemas acuáticos asociados a las aguas superficiales” estableciéndose los parámetros indicadores y criterios para su clasificación y “Buen estado químico del agua (“estado químico alcanzado por una masa de agua en la que las concentraciones de contaminantes no superan las normas de calidad medioambientales establecidas en las normas comunitarias pertinentes”). Las Normas de calidad medioambiental (NCA) se definen como “concentración de un contaminante o grupo de contaminantes en el agua, los sedimentos o la biota, que no debe ser superado en aras de la protección de la salud humana y el medio ambiente”.

La DMA establece en su Anexo VIII la denominada lista indicativa de sustancias contaminantes, que incluye las siguientes categorías de compuestos:

1. Compuestos organohalogenados y sustancias que pueden da origen a compuestos de esa clase en el medio acuático.
2. Compuestos organofosforados.
3. Compuestos organoestánicos.
4. Sustancias y preparados o derivados de ellos, cuyas propiedades cancerígenas, mutagénicas o que puedan afectar a la tiroides, esteroidegénicas, a la reproducción, o a otras funciones endocrinas en el medio acuático o a través del medio acuático estén demostradas.
5. Hidrocarburos persistentes y sustancias orgánicas tóxicas, persistentes y bioacumulables.

6. Cianuros.
7. Metales y sus compuestos.
8. Arsénico y sus compuestos.
9. Biocidas y productos fitosanitarios.
10. Materias en suspensión.
11. Sustancias que contribuyen a la eutrofización (en particular nitratos y fosfatos).
12. Sustancias que ejercen una influencia desfavorable sobre el balance de Oxígeno (y computables mediante parámetros tales como DBO y DQO).

Dentro de estos contaminantes, hay sustancias o grupo de sustancias que son tóxicas, persistentes y pueden causar bioacumulación así como otros grupos de sustancias que pueden entrañar un nivel de riesgo análogo. A estas sustancias se les denomina sustancias peligrosas prioritarias en el ámbito de la política de aguas. La primera lista de 33 sustancias fue establecida en 2001 y se convirtió en el Anexo X de la DMA. Con posterioridad ha ido revisándose cada cierto tiempo. La última revisión amplía el número de sustancias prioritarias a 45 además de revisar algunos límites de cuantificación requeridos. El objeto que se persigue es interrupción o supresión gradual de vertidos, emisiones y pérdidas en un plazo de veinte años con el objetivo último de conseguir concentraciones en el medio marino cercanas a los valores básicos por lo que se refiera a sustancias de origen natural y próximas a cero por lo que respecta a las sustancias sintéticas artificiales”.

Además de la lista anterior, la normativa comunitaria permite el establecimiento a nivel nacional de una lista de sustancias preferentes que complementa a la anterior de aplicación en todo el ámbito comunitario. Son contaminantes que presentan un riesgo significativo para las aguas superficiales de ese país debido a su especial toxicidad, persistencias o

bioacumulación o por la importancia de su presencia en el medio acuático. En España, fueron establecidos en el RD 60/2011 (Anexo II).

Tanto para las sustancias prioritarias como para las preferentes han sido aprobados sus NCA (tablas I.7 y I.8.)

Tabla I.7. Normas de calidad ambiental de las sustancias peligrosas prioritarias ($\mu\text{g/L}$)

Nº	Nombre de la sustancia	No CAS (1)	NCA- MA (2)	NCA- MA (2)	NCA- CMA (4)	NCA- CMA (4)	NCA	Identificada como sustancia peligrosa prioritaria
			Aguas superficiales continentales (3)	Otras aguas superficiales	Aguas superficiales continentales (3)	Otras aguas superficiales	Biota (12)	
1	Alacloro	15972-60-8	0,3	0,3	0,7	0,7		
2	Antraceno	120-12-7	0,1	0,1	0,1	0,1		X
3	Atrazina	1912-24-9	0,6	0,6	2	2		
4	Benceno	71-43-2	10	8	50	50		
5	Difeniléteres bromados (5)	32534-81-9			0,14	0,014	0,0085	X
6	Cadmio y sus compuestos (en función de las clases de dureza del agua) (6)	7440-43-9	$\leq 0,08$ (Clase 1)	0,2	$\leq 0,45$ (Clase 1)	$\leq 0,45$ (Clase 1)		X
	0,08 (Clase 2)		0,45 (Clase 2)		0,45 (Clase 2)			
	0,09 (Clase 3)		0,6 (Clase 3)		0,6 (Clase 3)			
	0,15 (Clase 4)		0,9 (Clase 4)		0,9 (Clase 4)			
	0,25 (Clase 5)		1,5 (Clase 5)		1,5 (Clase 5)			
(6 bis)	Tetracloruro de carbono (7)	56-23-5	12	12	No aplicable	No aplicable		
7	Cloroalcanos C10-13 (8)	85535-84-8	0,4	0,4	1,4	1,4		X
8	Clorfenvinfós	470-90-6	0,1	0,1	0,3	0,3		
9	Clorpirifós (Clorpirifós-etilo)	2921-88-2	0,03	0,03	0,1	0,1		

N°	Nombre de la sustancia	No CAS (1)	NCA- MA (2)	NCA- MA (2)	NCA- CMA (4)	NCA- CMA (4)	NCA	Identificada como sustancia peligrosa prioritaria
			Aguas superficiales continentales (3)	Otras aguas superficiales	Aguas superficiales continentales (3)	Otras aguas superficiales	Biota (12)	
(9 bis)	Plaguicidas de tipo ciclodieno:	309-00-2	$\Sigma = 0,01$	$\Sigma = 0,005$	No aplicable	No aplicable		
	Aldrina (7)	60-57-1						
	Dieldrina (7)	72-20-8						
	Endrina (7)	465-73-6						
	Isodrina (7)							
(9 ter)	DDT total (7) (9)	No aplicable	0,025	0,025	No aplicable	No aplicable		
	p,p'-DDT (7)	50-29-3	0,01	0,01	No aplicable	No aplicable		
10	1,2-Dicloroetano	107-06-2	10	10	No aplicable	No aplicable		
11	Diclorometano	75-09-2	20	20	No aplicable	No aplicable		
12	Ftalato de di(2- etilhexilo) (DEHP)	117-81-7	1,3	1,3	No aplicable	No aplicable		X
13	Diurón	330-54-1	0,2	0,2	1,8	1,8		
14	Endosulfán	115-29-7	0,005	0,005	0,01	0,004		X
15	Fluoranteno	206-44-0	0,0063	0,0063	0,12	0,12	30	
16	Hexaclorobenceno	118-74-1			0,05	0,05	10	X
17	Hexaclorobutadieno	87-68-3			0,6	0,6	55	X
18	Hexaclorociclohexano	608-73-1	0,02	0,002	0,04	0,02		X
19	Isoproturón	34123-59-6	0,3	0,3	1	1		
20	Plomo y sus compuestos	7439-92-1	1,2 (13)	1,3	14	14		
21	Mercurio y sus compuestos	7439-97-6			0,07	0,07	20	X
22	Naftaleno	91-20-3	2	2	130	130		
23	Níquel y sus compuestos	7440-02-0	4 (13)	8,6	34	34		
24	Nonilfenoles (4-Nonilfenol)	84852-15-3	0,3	0,3	2	2		X

N°	Nombre de la sustancia	No CAS (1)	NCA- MA (2)	NCA- MA (2)	NCA- CMA (4)	NCA- CMA (4)	NCA	Identificada como sustancia peligrosa prioritaria
			Aguas superficiales continentales (3)	Otras aguas superficiales	Aguas superficiales continentales (3)	Otras aguas superficiales	Biota (12)	
25	Octilfenoles	140-66-9	0,1	0,01	No aplicable	No aplicable		
	((4-(1,1',3,3'-tetrametilbutil)-fenol))							
26	Pentaclorobenceno	608-93-5	0,007	0,007	No aplicable	No aplicable		X
27	Pentaclorofenol	87-86-5	0,4	0,4	1	1		
28	Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) (11)	No aplicable	No aplicable	No aplicable	No aplicable	No aplicable		X
	Benzo(a)pireno	50-32-8	$1,7 \times 10^{-4}$	$1,7 \times 10^{-4}$	0,27	0,027	5	
	Benzo(b) fluoranteno	205-99-2	Véase la nota 11	Véase la nota 11	0,017	0,017	Véase la nota 11	
	Benzo(k) fluoranteno	207-08-9	Véase la nota 11	Véase la nota 11	0,017	0,017	Véase la nota 11	
	Benzo(g,h,i)perileno	191-24-2	Véase la nota 11	Véase la nota 11	$8,2 \times 10^{-3}$	$8,2 \times 10^{-4}$	Véase la nota 11	
	Indeno(1,2,3-cd)pireno	193-39-5	Véase la nota 11	Véase la nota 11	No aplicable	No aplicable	Véase la nota 11	
29	Simazina	122-34-9	1	1	4	4		
(29bis)	Tetracloroetileno (7)	127-18-4	10	10	No aplicable	No aplicable		
(29ter)	Tricloroetileno (7)	79-01-6	10	10	No aplicable	No aplicable		
30	Compuestos de tributilestaño (Cation de tributilestaño)	36643-28-4	0,0002	0,0002	0,0015	0,0015		X
31	Triclorobencenos	12002-48-1	0,4	0,4	No aplicable	No aplicable		
32	Triclorometano	67-66-3	2,5	2,5	No aplicable	No aplicable		

N°	Nombre de la sustancia	No CAS (1)	NCA- MA (2)	NCA- MA (2)	NCA- CMA (4)	NCA- CMA (4)	NCA	Identificada como sustancia peligrosa prioritaria
			Aguas superficiales continentales (3)	Otras aguas superficiales	Aguas superficiales continentales (3)	Otras aguas superficiales	Biota (12)	
33	Trifluralina	1582-09-8	0,03	0,03	No aplicable	No aplicable		X
34	Dicofol	115-32-2	$1,3 \times 10^{-3}$	$3,2 \times 10^{-5}$	No aplicable (10)	No aplicable (10)	33	X
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	X
36	Quinoxifeno	124495-18-7	0,15	0,015	2,7	0,54		X
37	Dioxinas y compuestos similares	Véase la nota 10, en el anexo X de la Directiva 2000/60/CE			No aplicable	No aplicable	Suma de PCDD + PCDF + PCB-DL 0,0065 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ TEQ (14)	X
38	Aclonifeno	74070-46-5	0,12	0,012	0,12	0,012		
39	Bifenox	42576-02-3	0,012	0,0012	0,04	0,004		
40	Cibutrina	28159-98-0	0,0025	0,0025	0,016	0,016		
41	Cipermetrina	52315-07-8	8×10^{-5}	8×10^{-6}	6×10^{-4}	6×10^{-5}		
42	Diclorvós	62-73-7	6×10^{-4}	6×10^{-5}	7×10^{-4}	7×10^{-5}		
43	Hexabromociclo dodecano (HBCDD)	Véase la nota 12, en el anexo X de la Directiva 2000/60/CE	0,0016	0,0008	0,5	0,05	167	X
44	Heptacloro y epóxido de heptacloro	76-44-8/1024-57-3	2×10^{-7}	1×10^{-8}	3×10^{-4}	3×10^{-5}	$6,7 \times 10^{-3}$	X
45	Terbutrina	886-50-0	0,065	0,0065	0,34	0,034		

(1) CAS: Servicio de resúmenes químicos (*Chemical Abstracts Service*).

(2) Este parámetro es la NCA expresada como valor medio anual (NCA-MA). Salvo que se especifique otra cosa, se aplica a la concentración total de todos los isómeros.

- (3) Las aguas superficiales continentales incluyen los ríos y lagos y las masas de agua artificiales o muy modificadas conexas.
- (4) Este parámetro es la NCA expresada como concentración máxima admisible (NCA-CMA). Cuando en la columna NCA-CMA se indica "No aplicable", se considera que los valores NCA-MA protegen contra los picos de contaminación a corto plazo en el caso de los vertidos continuos, ya que son significativamente inferiores a los valores calculados sobre la base de la toxicidad aguda.
- (5) Por lo que respecta al grupo de sustancias prioritarias incluidas en los difeniléteres bromados (no 5), las NCA se refieren a la suma de las concentraciones de los congéneres no 28, 47, 99, 100, 153 y 154.
- (6) Por lo que respecta al cadmio y sus compuestos (no 6), los valores de las NCA varían en función de la dureza del agua con arreglo a cinco categorías (clase 1: < 40 mg CaCO₃/l, clase 2: de 40 a < 50 mg CaCO₃/l, clase 3: de 50 a < 100 mg CaCO₃/l, clase 4: de 100 a < 200 mg CaCO₃/l, y clase 5: ≥ 200 mg CaCO₃/l).
- (7) Esta sustancia no es una sustancia prioritaria sino uno de los otros contaminantes para los cuales las NCA son idénticas a las establecidas en la legislación aplicable antes del 13 de enero de 2009.
- (8) No se señala para este grupo de sustancias ningún parámetro indicativo. El parámetro o parámetros indicativos deberán definirse mediante el método analítico.
- (9) El DDT total incluye la suma de los isómeros 1,1,1-tricloro-2,2-bis(p-clorofenil)-etano (no CAS 50-29-3; no UE 200-024-3); 1,1,1-tricloro-2-(o-clorofenil)-2-(p-clorofenil)-etano (no CAS 789-02-6; no UE 212-332-5); 1,1-dicloro-2,2-bis(p-clorofenil)-etileno (no CAS 72-55-9; no UE 200-784-6), y 1,1-dicloro-2,2-bis(p-clorofenil)-etano (no CAS 72-54-8; no UE 200-783-0).
- (10) No se dispone de suficiente información para establecer una NCA-CMA para estas sustancias.
- (11) Por lo que respecta al grupo de sustancias prioritarias de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) (no 28), las NCA de la biota y las correspondientes NCA-MA en el agua se refieren a la concentración de benzo(a)pireno, en cuya toxicidad se basan. El benzo(a)pireno puede considerarse como un marcador de los otros HAP, ya que solo tal sustancia debe ser objeto de seguimiento a efectos de comparación con las NCA de la biota o las correspondientes NCA-MA en el agua.
- (12) Salvo que se indique de otro modo, las NCA de la biota se refieren a los peces. Sustitutivamente podrá hacerse el seguimiento de otro taxón de la biota u otra matriz, siempre que las NCA aplicadas ofrezcan un nivel equivalente de protección. Para las sustancias con los números 15 (fluoranteno) y 28 (HAP), la NCA de la biota se refiere a crustáceos y moluscos. A efectos de evaluar el estado químico, no resulta adecuado el seguimiento del fluoranteno y de los HAP en los peces. Para la sustancia con el número 37 (dioxinas y compuestos similares), la NCA de la biota se refiere a los peces, los crustáceos y los moluscos en consonancia con el punto 5.3 del anexo del Reglamento (UE) no 1259/2011 de la Comisión, de 2 de diciembre de 2011, por el que se modifica el Reglamento (CE) no 1881/2006 en lo relativo a los contenidos máximos de dioxinas, PCB similares a las dioxinas y PCB no similares a las dioxinas en los productos alimenticios (DO L 320 de 3.12.2011, p. 18).
- (13) Estas NCA se refieren a las concentraciones biodisponibles de las sustancias.
- (14) PCDD: dibenzo-p-dioxinas policloradas; PCDF: dibenzofuranos policlorados; PCB-DL: policlorobifenilos similares a las dioxinas; TEQ: equivalentes tóxicos con arreglo a los Factores de Equivalencia Tóxica de 2005 de la Organización Mundial de la Salud.»

Sobre esta tabla pueden realizarse algunos comentarios respecto a estos grupos de sustancias. a) Sustancias indicadas con los números 5, 21, 28, 30, 35, 37, 43 y 44 (sustancias que se comportan como sustancias PBT ubicuas); b) sustancias indicadas con los números 34 a 45 (sustancias identificadas recientemente); c) sustancias indicadas con los números 2, 5, 15, 20, 22, 23 y 28 (sustancias para las que se establecen NCA revisadas más estrictas)

Tabla I.8. Normas de calidad ambiental de las sustancias peligrosas preferentes a nivel español ($\mu\text{g/L}$)

ANEXO II					
Normas de Calidad Ambiental para sustancias preferentes					
<i>Apartado A. Normas de Calidad Ambiental (NCA)</i>					
MA: media anual; Unidad: [$\mu\text{g/l}$].					
(1)	(2)	(3)	(4)		(5)
N.º	Nombre de la sustancia	N.º CAS ^(a)	NCA-MA ^(b) Aguas superficiales continentales ^(c)		NCA-MA ^(b) Otras aguas superficiales
(1)	Etilbenceno	100-41-4	30		30
(2)	Tolueno	108-88-3	50		50
(3)	1, 1, 1 – Tricloroetano	71-55-6	100		100
(4)	Xileno (Σ isómeros orto, meta y para)	1330-20-7	30		30
(5)	Terbutilazina	5915-41-3	1		1
(6)	Arsénico	7440-38-2	50		25
(7)	Cobre ^(d)	7440-50-8	Dureza del agua (mg/L CaCO_3)		25
			$\text{CaCO}_3 \leq 10$	NCA-MA 5	
			$10 < \text{CaCO}_3 \leq 50$	22	
			$50 < \text{CaCO}_3 \leq 100$	40	
			$\text{CaCO}_3 > 100$	120	
(8)	Cromo VI	18540-29-9	5		5
(9)	Cromo	7440-47-3	50		no aplicable
(10)	Selenio	7782-49-2	1		10
(11)	Zinc ^(d)	7440-66-6	Dureza del agua (mg/L CaCO_3)		60
			$\text{CaCO}_3 \leq 10$	NCA-MA 30	
			$10 < \text{CaCO}_3 \leq 50$	200	
			$50 < \text{CaCO}_3 \leq 100$	300	
			$\text{CaCO}_3 > 100$	500	
(12)	Cianuros totales	74-90-8	40		no aplicable
(13)	Fluoruros	16984-48-8	1700		no aplicable
(14)	Clorobenceno	108-90-7	20		no aplicable
(15)	Diclorobenceno (Σ isómeros orto, meta y para)	25321-22-6	20		no aplicable
(16)	Metolacoloro	51218-45-2	1		no aplicable

(a) CAS: Chemical Abstracts Service.
 (b) Este parámetro es la norma de calidad ambiental expresada como valor medio anual (NCA-MA).
 (c) Las aguas superficiales continentales incluyen ríos y lagos y las masas de agua artificiales o muy modificadas conexas.
 (d) Por lo que respecta a estas sustancias, los valores de la NCA en aguas superficiales continentales varían en función de la dureza del agua con arreglo a cuatro categorías.

Además de las sustancias preferentes y prioritarias, y debido a los nuevos contaminantes que están surgiendo como potencialmente peligrosos para el medio ambiente, la DMA indica que deben de realizarse una serie de “listas de observación” las cuales deben ir incluyendo nuevos contaminantes en base a estudios medioambientales y que deben ser propuestos por los distintos Estados miembros. En marzo de 2015 ya se publicó una primera lista que incluye 10 nuevos compuestos. Como se puede observar en la tabla I.9, se incorporan sustancias de diversa naturaleza como fármacos, hormonas, etc.

Tabla I.9. Lista de sustancias incluidas en la lista de observación Decisión de ejecución (UE) 2015/495 de la comisión y sus límites.

Nombre de la sustancia/grupo de sustancias	No CAS(1)	No UE(2)	Método analítico indicativo(3)(4)(5)	Límite máximo aceptable de detección del método (mg/L)
17-alfa-Etinilestradiol (EE2)	57-63-6	200-342-2	SPE-LC-MS-MS en grandes volúmenes	0,035
17-beta-Estradiol (E2), estrona (E1)	50-28-2, 53-16-7	200-023-8	SPE-LC-MS-MS	0,4
Diclofenaco	15307-86-5	239-348-5	SPE-LC-MS-MS	10
2,6-di-terc-Butil-4-metilfenol	128-37-0	204-881-4	SPE-GC-MS	3 160
4-Metoxicinamato de 2-etilhexilo	5466-77-3	226-775-7	SPE-LC-MS-MS o GC-MS	6 000
Antibióticos macrólidos(6)			SPE-LC-MS-MS	90
Metiocarb	2032-65-7	217-991-2	SPE-LC-MS-MS o GC-MS	10
Neonicotinoides(7)			SPE-LC-MS-MS	9
Oxadiazón	19666-30-9	243-215-7	LLE/SPE-GC-MS	88
Trialato	2303-17-5	218-962-7	LLE/SPE-GC-MS o LC-MS-MS	670

(1) *Chemical Abstracts Service*. (2) Número de la Unión Europea — No disponible para todas las sustancias. (3) Para garantizar la comparabilidad de los resultados de los diferentes Estados miembros, todas las sustancias serán objeto de seguimiento en toda la muestra de agua. (4) Métodos de extracción: LLE—extracción líquido-líquido SPE—extracción en fase sólida Métodos analíticos: GC-MS—cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas LC-MS-MS—cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem con triple cuadrupolo. (5) Para el seguimiento del 4-metoxicinamato de 2-etilhexilo en las partículas en suspensión (SPM) o los sedimentos (tamaño < 63 µm), se impone el siguiente método analítico: SLE (extracción sólido-líquido) — GC-MS, con un límite máximo de detección de 0,2 mg/kg. (6) Eritromicina (n.º CAS: 114-07-8; n.º UE 204-040-1), claritromicina (n.º CAS 81103-11-9), azitromicina (n.º CAS 83905-01-5; n.º UE 617-500-5). (7) Imidacloprid (n.º CAS 105827-78-9/138261-41-3, n.º UE 428-040-8), tiacloprid (n.º CAS 111988-49-9), tiametoxam (n.º CAS: 153719-23-4; n.º UE 428-650-4), clotianidina (n.º CAS: 210880-92-5; n.º UE 433-460-1), acetamiprid (n.º CAS 135410-20-7/160430-64-8).

Dentro del grupo de los contaminantes emergentes de encuentran las fragancias, las cuales en la actualidad, no están sujetas a ninguna normativa que regule el uso de almizcles en el medioambiente, ni metodología, ni límites permisibles para cada compuesto. Tampoco se encuentra en ninguna listas de la NCA.

CAPÍTULO II:

MÉTODOS EXPERIMENTALES

1. Introducción

En el presente capítulo se escriben los métodos experimentales utilizados en la presente tesis doctoral.

En primer lugar, se describe la toma de muestras, tanto los procedimientos como las muestras reales analizadas aplicando el método desarrollado en la presente tesis doctoral.

En segundo lugar, se describen los procedimientos utilizados para la preparación de las muestras en lo concerniente a la extracción de los analitos. Estos procedimientos serán utilizados en el proceso de selección y optimización del método que se desarrolla en el capítulo III.

En tercer lugar, se describe la metodología de determinación analítica utilizada en esta tesis doctoral, en concreto las técnicas cromatográficas de gases con detector de espectrometría de masas.

En cuarto lugar, se realiza una descripción del método analítico completo, un método optimizado (capítulo III) y validado (capítulo IV).

Por último se describen los distintos patrones, reactivos e instrumentación auxiliar empleada en el presente trabajo.

2. Toma de muestras

2.1. Introducción

Una vez validado el método (Capítulo IV) se decidió probarlo en muestras reales de distintos tipos: aguas superficiales de río, aguas de mar y aguas residuales urbanas. Se realizó el muestreo a lo largo de un año en las distintas estaciones (primavera, verano, otoño e invierno), para comprobar si se

observa alguna tendencia o cambio a lo largo del tiempo con las distintas estaciones meteorológicas.

Se muestrearon aguas superficiales, donde se concentran este tipo de microcontaminantes. Se tomaron muestras en la dársena del río Guadalquivir a su paso por el centro de la ciudad a la altura de Plaza de Arma y en el río Guadalquivir antes de su desembocadura en Coria del Río. También se tomaron muestras en el Río Guadaira, a su paso por Bellavista en Sevilla (estación de la red SAICA) y en Alcalá de Guadaira (bajo el Puente del Dragón). Las muestras de agua de mar se tomaron en la provincia de Huelva, en las playas de Punta Umbría, Punta del Moral, Mazagón y El Espigón, todas ellas tomadas desde la orilla. Las aguas residuales fueron muestreadas en la planta del Centro de las Nuevas Tecnologías del Agua (CENTA) que depura las aguas procedentes de una población pequeña como Carrión de los Céspedes y en la estación de depuración de aguas del Copero, la más grande de toda Andalucía. En estas dos depuradoras se tomaron muestras a la entrada y a la salida de los procesos primario y secundario.

Fueron tomadas 11 muestras (en cada uno de los cuatro muestreos realizados, haciendo un total de 44 muestras, todas ellas medidas 10 veces), de las cuales, dos pertenecen al río Guadalquivir, dos al río Guadaira, una a agua de mar y 6 muestras, en dos EDAR.

2.2. Equipo de toma de muestras

Las muestras fueron tomadas en botes de vidrio topacio de 250 ml con tapón roscado, no dejando aire en el interior del recipiente. Para que no se produzca la pérdida de compuestos volátiles, las muestras se mantienen refrigeradas hasta su análisis.

➤ Toma de muestra manual

Las muestras fueron tomadas desde la orilla en la mayoría de los casos de forma rudimentaria (figura II.1), con la ayuda de un cubo o directamente con la mano si era posible.



Figura II.1. Toma de muestras manual

➤ **Equipo de toma de muestra automática EDAR**

Los equipos muestreadores de planta (figura II.2) son de la marca ISCO modelo 3700 FR, tratándose de equipos fijos y refrigerados, y pueden ser programados para muestreos automáticos, a diferentes tiempos de muestreo no teniendo que ser los tiempo de muestreo constantes e incluso con una diferencia de hasta 12 horas entre muestras. Tienen capacidad para 24 botellas de vidrio de 350 ml, aunque esto puede ser modificado para tamaños de recipientes superiores. La succión de la muestra, la realiza con una bomba peristáltica que trabaja a 250 rpm, a través de tubos de PTFE. La toma de muestra también se puede realizar de forma manual, activando la bomba en el momento necesario.



Figura II.2. Equipos muestreador automático

2.3. Aguas superficiales

En la figura II.3, se representa un mapa de muestreo de la provincia de Sevilla, donde se marcan los puntos de toma de muestra seleccionados y que se desarrollaran con más detalle a continuación.



Figura II.3. Mapa de muestreo de la provincia de Sevilla.

2.3.1. Río Guadalquivir

El Guadalquivir es el río principal del sur de la Península Ibérica. Su cuenca hidrográfica abarca territorios de Jaén, Córdoba, Almería, Granada, Málaga, Sevilla, Huelva y Cádiz, así como de Murcia, Albacete, Ciudad Real y Badajoz. Desemboca en el Océano Atlántico por Sanlúcar de Barrameda, en un amplio estuario entre la provincia de Cádiz y la de Huelva. Entre Sevilla y el estuario (figura II.4), se sitúa una amplia zona húmeda: las Marismas del Guadalquivir. Dejando a la derecha Coria del Río y la Puebla del Río, se divide por debajo de éstos en varios brazos y zonas semipantanosas llamadas las Marismas del Guadalquivir, por donde pasa por la última ciudad de la provincia de Sevilla: la localidad de Lebrija. Tras un recorrido de 657 kilómetros.

La Dársena del Guadalquivir corresponde al antiguo cauce del río Guadalquivir, que una vez canalizado discurre al oeste del antiguo mercado de Tablada. Actualmente se encuentra cegado al norte por la corta de la Cartuja, conectándose el puerto de Sevilla, que quedó en el interior del canal, con la vía fluvial por una esclusa situada al sur que permite el tráfico marítimo. Se halla en el municipio de Sevilla excepto dos pequeños sectores, uno situado al sur que pertenece al de Dos Hermanas y en la parte norte otro (la ribera oeste) al de Santiponce. Posee unos 13,5 kilómetros de longitud, con un ramal del puerto de unos 800 metros, y la salida al río por la esclusa de casi 3 Km. Se pueden observar los dos puntos de muestreo específicos en las figuras II.5 y II.6.



Figura II.4. Mapa de la dársena y cauce del río Guadalquivir en Sevilla.



Figura II.5. Muestra del río Guadalquivir tomada en Sevilla (Plaza de Armas)



Figura II.6. Muestra del río Guadalquivir tomada en Coria del Río

2.3.2. Río Guadaira

Su cuenca hidrográfica se extiende por los términos municipales de Morón de la Frontera, Marchena, Utrera, Paradas, Arahal, Mairena del Alcor, El Viso del Alcor, Alcalá de Guadaíra, Sevilla y otros (figura II.7). Se pueden observar los dos puntos de muestreo específicos en las figuras II.8 y II.9.

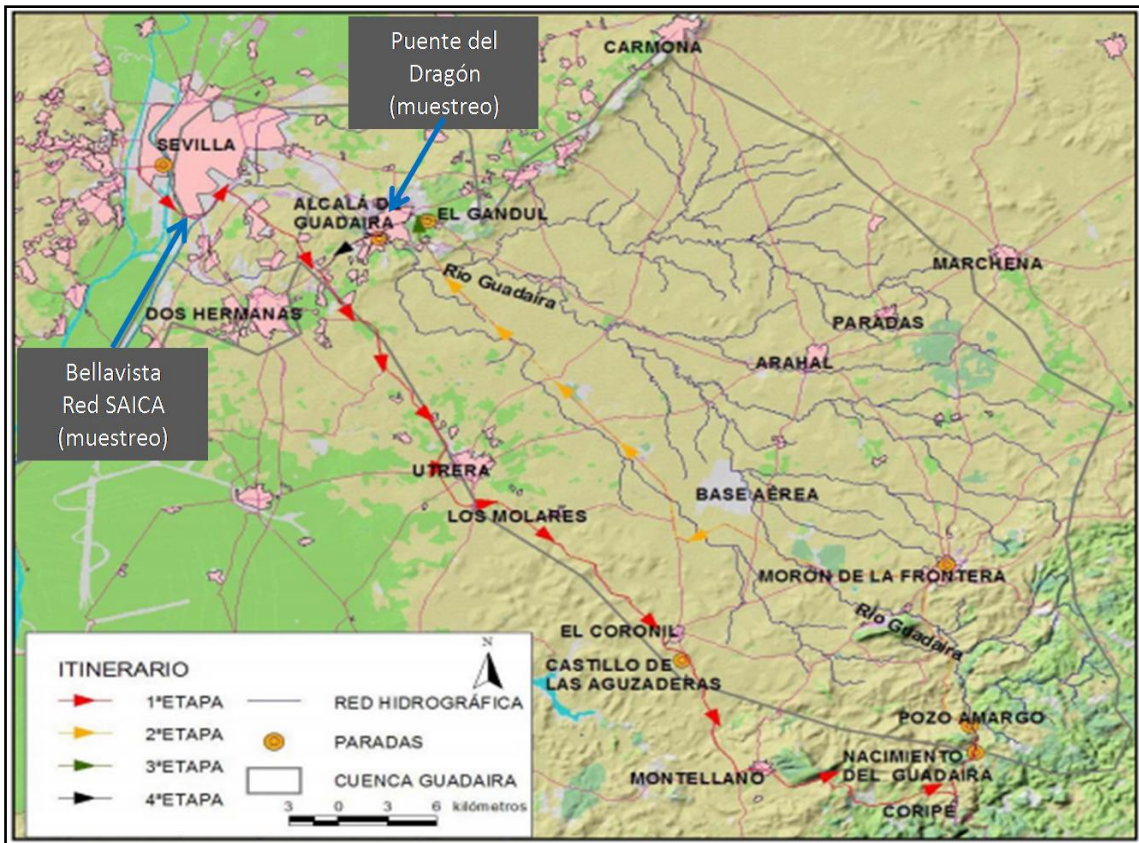


Figura II.7. Recorrido del río Guadaira



Figura II.8. Muestra del río Guadaira tomada en Bellavista (Estación de la Red Saica)



Figura II.9. Muestra del río Guadaira tomada en Alcalá de Guadaira (Puente del Dragón)

2.4. Agua de mar

Las muestras de agua de mar se tomaron en la costa de Huelva, en las playas de Punta Umbría, Punta del Moral, Mazagón y El Espigón, todas ellas tomadas desde la orilla, marcadas en el mapa como una estrella (figura II.10). En la figura II.11, imagen particular de la muestra tomada en la Punta del Moral.



Figura II.10. Imágenes de la costa de Huelva.



Figura II.11. Muestra de la playa de Punta del Moral.

2.5. Aguas residuales urbanas

Las muestras de aguas residuales fueron tomadas en dos estaciones de depuración de aguas residuales, como son la del Copero y el CENTA. Las cuales se detallan en los siguientes subapartados.

Se planteo un diseño de muestreo consistente en tomar tres muestras a lo largo del proceso de depuración:

1ª.- La entrada de agua bruta que recepciona la estación de depuración de aguas residuales, como punto de partida y primera muestra.

2ª.- Seguidamente se tomaría muestra a la salida de cada proceso de depuración de aguas, como sería la salida de un tratamiento primario, siendo la segunda muestra.

3ª.- Por último, la salida del tratamiento secundario, como tercera muestra. Correspondiendo esta toma de muestra, con el del agua de salida de la EDAR.

2.5.1. CENTA

El Centro de las Nuevas Tecnologías del Agua (CENTA) es un Centro de Investigación, se encuentran en el municipio sevillano de Carrión de los Céspedes. Estas instalaciones cuentan con la plataforma experimental (figura II.12) en depuración de aguas de mayor escala que existe en el mundo, tanto por su dimensión como por el elevado número de prototipos que en ella se investigan, desarrollan y validan, coexistiendo así en un mismo espacio las tecnologías más avanzadas y sofisticadas con sistemas naturales de depuración. Los prototipos de depuración de agua para los tratamientos primarios y secundarios muestreados, son más avanzados que las tecnologías convencionales de una EDAR tradicional.



Figura II.12. Esquema de la planta experimental de Carrión de los Céspedes.

La capacidad máxima de depuración de la Planta Experimental de Carrión de los Céspedes es para un total de 5.000 habitantes, de 142.000 m³/año, es decir, aproximadamente 400 m³ diarios. Entrada de agua residual procedente de la pequeña población de Carrión de los Céspedes (figuras II.13). En las figuras II.13, II.14 y II.15, se aprecian los puntos concretos de toma de muestras.



Figura II.13. Muestras tomadas en el CENTA (Entrada)

Se toman muestras a la salida del proceso primario (figuras II.14) que correspondiente al área de filtración, pertenecientes al proyecto SMART WETLAND. Este proyecto combina e integra la depuración de aguas de pequeñas poblaciones con elementos tecnológicos, con el objetivo de mejorar la gestión y eficacia de los humedales artificiales. La integración persigue la construcción de un humedal "inteligente" que contenga bacterias con capacidades bioelectrogénicas óptimas y un diseño capaz de auto gestionar su funcionamiento bioelectroquímico, como respuesta a las características del agua residual.



Figura II.14. Muestras tomadas en el CENTA (salida de proceso primario)

Este prototipo se corresponde con un proceso de depuración secundario (figuras II.15). El prototipo será utilizado en las Estaciones de Servicio de

CEPSA al objeto de depurar las aguas residuales de carácter doméstico generadas en las mismas, en cumplimiento de la normativa de vertidos vigente. El prototipo se ha instalado en el Centro Experimental de la Fundación al objeto de someterse al ensayo de eficiencia de depuración definido por la norma EN 12566-3 como paso previo a la obtención de la marcado CE de este producto.



Figura II.15. Muestras tomadas en el CENTA salida del tratamiento secundario (Proceso secundario igual a la salida)

2.5.2. COPERÓ

La EDAR Copero tiene una capacidad actual de tratamiento de 255 000 m³/día y depura las aguas residuales de la cuenca sur de Sevilla, la población de Dos Hermanas y el polígono industrial La Isla. Esta situado en la barriada de

Fuente del Rey. Su capacidad de diseño es para una población total de 950.000 habitantes equivalentes.

Se ha desarrollado en tres fases. La primera de ellas, origen de la EDAR, se puso en servicio en 1987 consistente en un tratamiento primario con su correspondiente línea de fangos con digestión anaerobia. Fue ampliada con los mismos procesos en 1993 y, finalmente, en el año 2001, se puso en marcha el tratamiento secundario con ampliación de la línea de fangos. Desde 2003 cuenta con aprovechamiento energético del gas producido, con una potencia de cogeneración de 4 x 630 (kWh). En sus terrenos se encuentra una planta solar fotovoltaica de 1 MW de potencia nominal.

Esta EDAR posee tratamiento secundario biológico (fangos activos) y tratamiento de estabilización de fangos mediante digestión anaerobia y deshidratación.

Este esquema general corresponde a los procesos y etapas, que corresponde a una estación depuradora de aguas residuales, que se puede encontrar en cualquier municipio (figura II.16) y en la figura II.17, imagen de la planta de depuración de aguas del Copero.



Figura II.16. Esquema de procesos de una EDAR convencional.

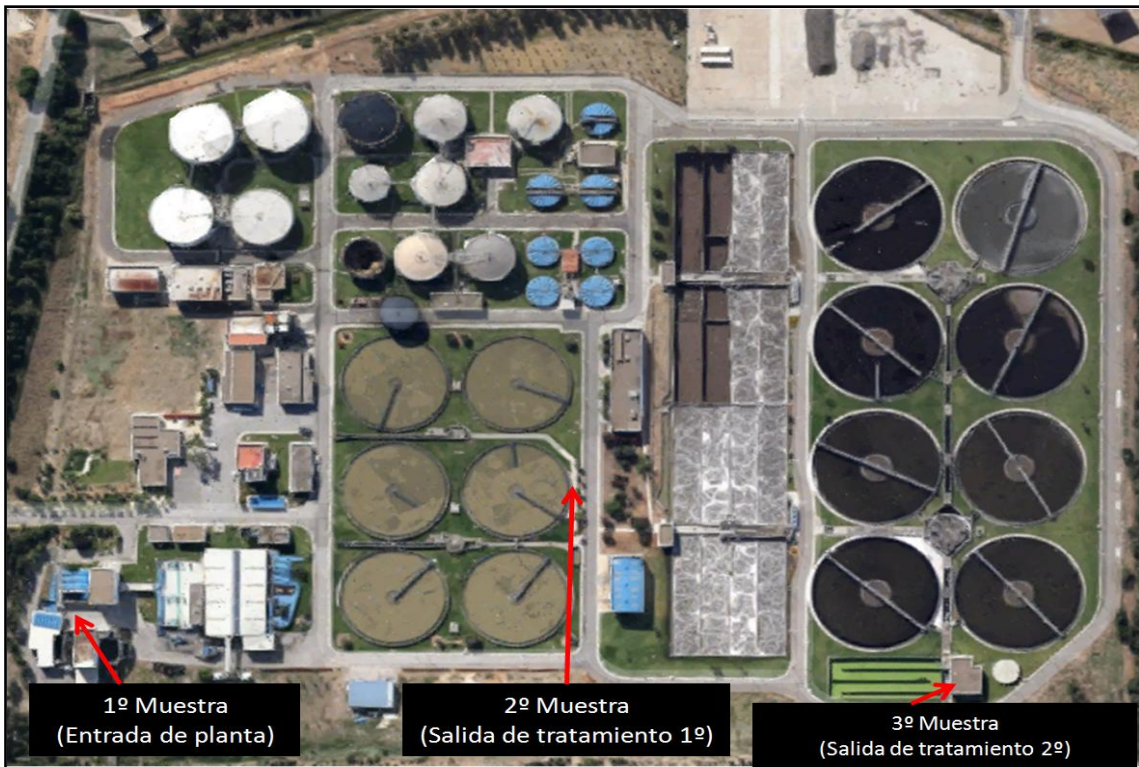


Figura II.17. Imagen de la EDAR Copero

Se tomaron muestras a la entrada de la depuradora del agua antes del tratamiento, obteniendo el agua de partida (figuras II.18). Después del proceso primario (figuras II.19) y a la salida del proceso secundario (figuras II.20), que corresponde a la salida del agua de la EDAR.



Figura II.18. Muestras tomadas en la EDAR Copero (Entrada)



Figura II.19. Muestras tomadas en la EDAR Copero (salida de proceso primario)



Figura II.20. Muestras tomadas en la EDAR Copero (salida de proceso secundario igual a la salida de depuradora)

3. Preparación de muestras: Extracción de analitos

Según se indicó en el capítulo I, después de una extensa búsqueda bibliográfica, sobre los compuestos objeto de estudio (galaxolide, tonalide, almizcle ambreta, almizcle xileno y almizcle cetona) se ensayaron diferentes métodos de extracción de estos compuestos en agua como son, extracciones líquido-líquido, extracción en fase sólida y la microextracción en fase sólida (SPME), con la finalidad de comprobar cuál de ellos es más adecuado para los compuestos seleccionados.

Los resultados obtenidos en cada técnica se describen en el capítulo III.

3.1. Extracción Líquido-Líquido

Se han ensayado dos procedimientos de extracción, uno en el que la separación se realiza en: agua - tolueno y otro en agua - n-hexano, todos ellos por triplicado.

3.1.1. Extracción con tolueno.

En un recipiente de vidrio se añade 50 µl de patrón (constituido por 1 ppm de cada compuesto en acetona) en 500 ml de agua, con 10 ml de tolueno, un imán de agitación y se agita vigorosamente durante 20 minutos, con el recipiente cerrado. Se congela durante toda la noche (12 horas) y a la mañana siguiente se separa el tolueno. Se concentra a 1 ml con una corriente de nitrógeno o en rotavapor. Se realizaron tres replicas y se inyectan por triplicado (este procedimiento se llevo a cabo en tres días diferentes). Conjuntamente se prepara un patrón de la misma concentración en tolueno sin extracción, que se inyecta al principio y al final de la secuencia (por duplicado), considerando la media de sus resultados como el 100 % de recuperación (resultados capítulo III).

3.1.2. Extracción con n-hexano.

En un embudo de decantación se hacen tres separaciones con 5 ml de n-hexano, partiendo de un litro de muestra en el cual se ha añadido 0,1 ml de los patrones de 1 ppm de cada compuesto en acetona. El hexano extraído se concentra hasta 1 ml en una corriente de nitrógeno. Se prepara un patrón de 100 µg/L sin extracción.

Después de múltiples prueba, intentando optimizar el gasto de disolvente para la máxima recuperación de los compuestos se llega a una extracción favorable para estas fragancias, como se describe a continuación.

En un embudo de decantación se hacen tres separaciones, las dos primeras con 25 ml y la última con 15 ml de n-hexano, partiendo de medio litro de agua. Para favorecer el paso de los compuesto al hexano, se ha añadido 5 g de NaCl y 5 gotas de HCl (2 N) que consigue un pH~ 3. Las muestras se concentran en un rotavapor hasta 1 ml de n-hexano, la concentración de las muestras en rotavapor presenta resultados más repetitivos y de menos tiempo de preparación, que mediante corriente de nitrógeno. Se realizaron tres replicas y se inyectan por triplicado (tres días diferentes). Conjuntamente se prepara el patrón en hexano sin extracción, que se inyecta al principio y al final de la secuencia (por duplicado), considerando la media de sus resultados como el 100 % de recuperación (resultados capítulo III).

3.2. Extracción en fase sólida (SPE)

Se ha probado realizar la extracción de los compuestos mediante cartuchos de extracción en fase sólida, siguiendo los pasos que se detallan a continuación:

1º Paso: Acondicionamiento del cartucho (Strata-X 33u Polimeric reversed phase 200mg/ 6 ml). Se añade 5 ml de n-hexano; 5 ml de acetato de etilo; 5ml de metanol y 10 ml de agua miliQ. Todo se deja pasar por gravedad.

2º Paso: Se preparan medio litro de agua miliQ, en la cual se ha añadido 50 µl de patrones de 1 ppm en acetona. Las muestras se preparan por triplicado.

3º Paso: Se deja pasar por el cartucho a una velocidad de 3 gotas por segundo.

4º Paso: Se deja pasar aire por el cartucho (aprox. 20 min) y posteriormente se seca el cartucho con nitrógeno gas (aprox. 10 min).

5º Paso: se eluyen los cartucho con 10 ml de n-hexano y 5 ml de acetato de etilo, por gravedad.

6º Paso: Se concentra en el rotavapor, calentando el baño a 60°C y ayudado con una bomba de vacío al principio del proceso (evitando que el disolvente entre en ebullición), velocidad de giro 5, hasta un volumen de 1 ml.

Se realizaron tres replicas y se inyectan por triplicado. Conjuntamente se prepara un patrón de n-hexano sin extracción, que se inyecta al final de la secuencia, considerando el resultado como el 100 % de recuperación.

Esta extracción se llevo a cabo en tres ocasiones, por triplicado como se ha descrito.

3.3. Microextracción en fase sólida (SPME)

Hay dos opciones de trabajar en SPME: 1. Sumergiendo la fibra en la muestra líquida. 2. Mediante la técnica de espacio en cabeza. Las fibras son muy delicadas, con una facilidad de rotura enorme. Si se trabaja con compuestos volátiles o semivolátiles, es más recomendable para el buen estado y durabilidad de la fibra el usarla mediante espacio en cabeza.

También habría que tener en consideración el tipo de muestras a analizar, como por ejemplo: en el caso de aguas residuales debido a la gran suciedad que presentan deterioraría la fibra en pocas inyecciones.

Se eligió hacer microextracción en fase sólida mediante espacio en cabeza, donde la fibra no entra en contacto con la muestra en ninguna ocasión.

Las fibras comercialmente están clasificadas por colores que corresponden con su composición y el grosor del recubrimiento de la fibra, como son:

- Carboxen/ Polydimethylsiloxane (Carboxen / PDMS), de color negro con 75 μm de grosor.
- Polydimethylsiloxane (PDMS), de color rojo con 100 μm de grosor.
- Polydimethylsiloxane / Divinylbenzene (PDMS/DVB), de color azul con 65 μm de grosor.
- Polyacrylate, de color blanco con 85 μm de grosor.
- Divinylbenzene / Carboxen / Polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS), de color gris con 50/30 μm de grosor.

Cada fibra presenta unas condiciones de acondicionamiento antes de su uso, rango de pH, rango de temperaturas de trabajo y temperatura máxima, que se pueden ver descritas en la siguiente tabla II.1.

Tabla II.1. Especificaciones de cada tipo de fibra

Recubrimiento fibra	Espesor película	pH	T ^a Máx (°C)	T ^a de trabajo (°C)	T ^a de acondicionamiento (°C)	Tiempo de acondicionamiento (Hrs)
PDMS	100 μm	2-10	280	200-280	250	0,5
PDMS/DVB	65 μm	2-11	270	200-270	250	0,5
Polyacrylate	85 μm	2-11	320	220-300	280	1
Carboxen/PDMS	75 μm	2-11	320	250-310	300	1
DVB/CAR/PDMS	50/30 μm	2-11	270	230-270	270	1

La elección de la fibra se ha realizado con la preparación de patrones en agua miliQ, con concentraciones de 0,1 ppb; 1 ppb; 10 ppb; 100 ppb; de los cuales, se han tomado 5 ml en un vial de espacio en cabeza de 20 ml y se ha

inyectado en el método con el resto de los parámetros de extracción, desorción y detección iguales. Se han comparado las intensidades de los picos para cada una de las fragancias objeto de estudio de este trabajo (resultados capítulo III).

El procedimiento de extracción sería el siguiente, optimizado para este tipo de compuestos.

1. Añadir 2 gramos de NaCl a un vial de espacio en cabeza que presenta un volumen de 20 ml.

2. Introducir un volumen de 10 ml de muestra, no agitar.

3. Cerrar el vial con un tapón roscado de aluminio con septum, no agitar el vial. Las muestras se colocan en la bandeja del automuestreador (8 x 4) desde las cual van a ser llevadas a un bloque de incubación de muestras (ver figura II.22), a través del brazo automatizado del CombiPal.

4. Se realiza una preincubación del vial durante 2 minutos, a la temperatura de incubación de 100 °C y con agitación de 500 rpm, para la disolución de la sal.

5. Introducción de la fibra en el vial a una profundidad de 22 mm contados desde la cabeza del vial.

6. Incubación del vial durante 30 min a 100°C, se produce el paso de los compuestos a fase gaseosa y su absorción en la fibra.

7. La desorción de la fibra se realiza en el inyector del cromatógrafo de gases durante 10 min a la temperatura de acondicionamiento de la fibra, en este caso a 250°C.

Como se verá en el capítulo III, este último procedimiento fue el elegido para seguir desarrollando esta tesis, debido a que estos son los resultados que se han obtenido de cada uno de los procesos de optimización.

4. Equipo cromatográfico CG/MS/MS

Se describe a continuación la meteorología propuesta para el análisis de fragancias en muestras de aguas. La optimización y validación se describen en los capítulos III y IV.

4.1. Instrumentación analítica: sistema cromatográfico

4.1.1. Introducción

El equipo utilizado para esta tesis doctoral (ver figura II.21), está situado en el Servicio General de Microanálisis del Centro de Investigación Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS) y es un cromatógrafo de gases, acoplado a detector de espectrometría de masa triple cuadrupolo. Partes del equipo:

- Cromatógrafo de gases BRUKER 450.
- Inyector capilar universal con control electrónico de flujo
- Inyector automático BRUKER COMBIPAL
- Bloques de inyección: líquida, espacio en cabeza, microextracción en fase sólida
- Fuente de ionización con impacto electrónico
- Detector de masas/masas BRUKER 320, triple cuadrupolo
- Software Bruker WS, MS workstation version 7.0

A continuación se detallan las características de cada uno de los módulos que componen el equipo:

4.1.2. El Cromatógrafo de gases

Consta de las siguientes partes:

En la parte superior lleva las bandejas de colocación de muestras (figura I.22) que pueden ser de diferentes tipos dependiendo del tamaño de los viales que se necesiten: para viales de 2 ml es de 98 posiciones (7 x 14) y para viales de 10-20 ml es de 32 posiciones (4 x 8).

Inyector capilar universal con control electrónico de flujo, modelo 1079 con temperatura programable, modo de trabajo en split o splitless, pudiendo programar el cambio de un modo a otro a lo largo del proceso cromatográfico, controlador de flujo y de presiones desde 0 a 150 psi. Se puede trabajar con diferentes tipos de liner: para inyección líquida, SPME o grandes volúmenes (LVI).

Horno con capacidad para tres columnas simultáneamente, con un rango de temperatura desde ambiental hasta 450 °C y velocidad de calentamiento de hasta 120 °C/min. Velocidad de enfriamiento desde 400 °C a 50 °C en 4,5 min. El cromatógrafo puede ser manejado de forma automática desde el propio instrumento o de forma remota mediante el software instalado en el ordenador.



Figura II.21. Imagen del equipo utilizado.

4.1.3. Inyector automático

El automuestrador CombiPal (figura II.22), es un inyector automático robotizado, que permite los siguientes modos de operación:

- Inyección de líquidos en modo split, splitless, On-Column
- Inyector de muestras de espacio en cabeza termostataizado
- Inyector de líquidos en grandes volúmenes
- Extracción e inyección en modo SPME

Permite la programación de los parámetros de la inyección como pueden ser: la velocidad de inyección y succionamiento de muestra, tiempo de lavado, volumen de disolventes, lavado con dos disolventes diferentes, etc. Posibilidad de incubar la muestra entre 40-200 °C, con agitación orbital, calentamiento individualizado de cada muestra, en horno de 6 posiciones de viales para calentamiento de las siguientes muestras mientras se analiza, con el fin de minimizar los tiempos muertos.

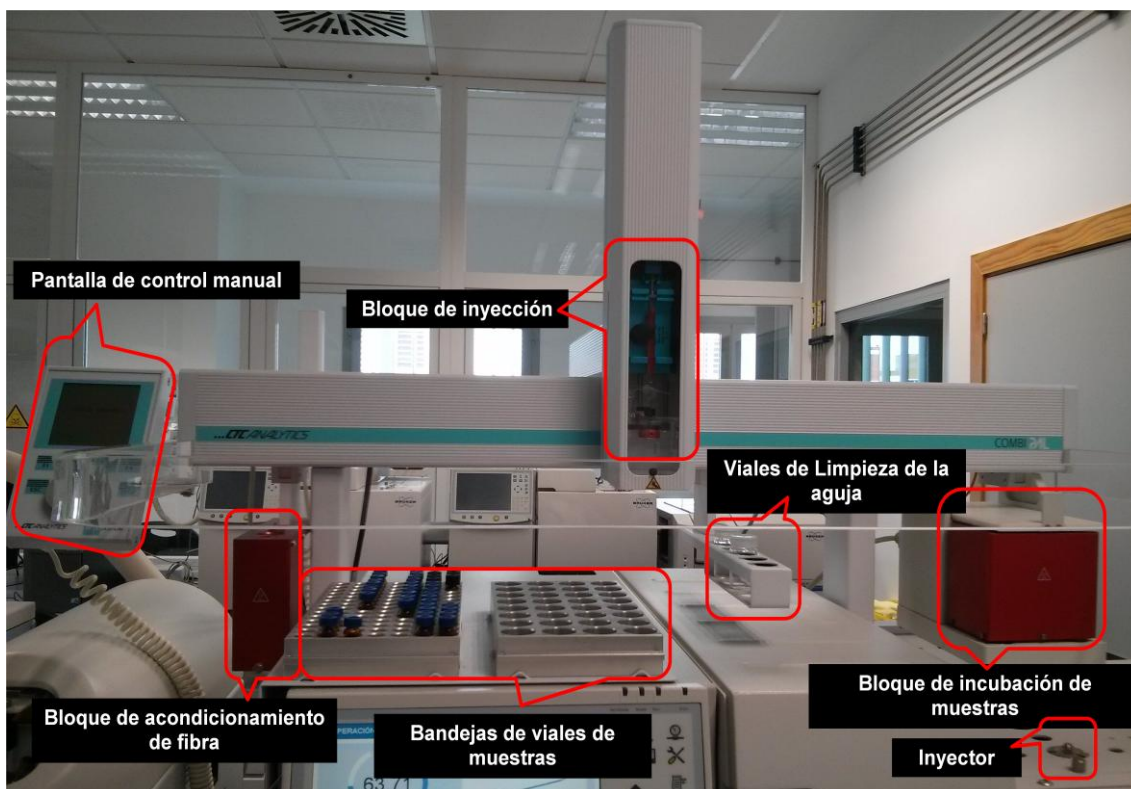


Figura II.22. Imagen del CombiPal, indicando sus diferentes módulos.

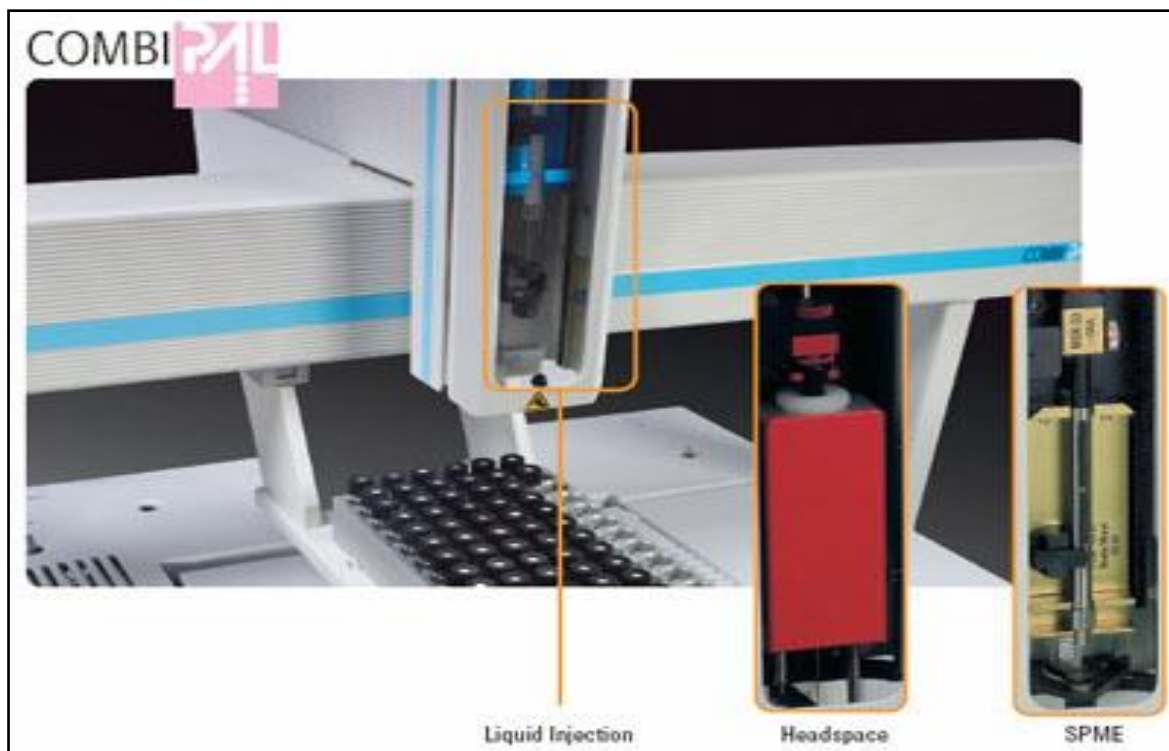


Figura II.23. Imagen de los bloques de inyección: líquida, espacio en cabeza, microextracción en fase sólida

Posibilidad de acondicionar la fibra en el bloque destinado para ello, dejando libre el inyector. Los bloques de inyección (figura II.23) son independientes e intercambiables, no se pueden usar simultáneamente. Cada uno de ellos tiene características diferentes. El de inyección líquida es de color azul y está constituido por una jeringa de 10 μL . El bloque de espacio en cabeza es de color rojo, puede tener una capacidad de volumen para gases de 1; 2,5 ó 5 mL. Por último el bloque de SPME, de color dorado está constituido por una jeringa especial donde puede enroscarse la aguja que contiene la fibra.

4.1.4. Fuente de ionización

El paso de los compuestos desde el cromatógrafo al detector de espectrometría de masas se realiza a través de la línea de transferencia, es la interfase que conecta ambos equipos. Mediante una línea de transferencia directa con calentamiento independiente, entre 50°C y 350°C. La cual tiene que tener una temperatura igual o superior a la temperatura final de la rampa del

horno, para que los compuestos no condensen en ella y lleguen a la fuente de ionización.

La fuente de ionización de impacto electrónico está constituida por un prefiltro hexapolar para aislamiento de la fuente evitando cualquier posible contaminación del analizador y permitiendo una excepcional estabilidad de masas. La temperatura de la fuente es programable entre 20-325°C. El hexápodo actúa como un filtro focalizando los iones antes de la entrada al analizador de masas. Con esto se consigue que se mantengan los cuadrupolos limpios, separando la fuente del analizador. Los iones entran en el analizador mientras que las especies neutras son enviadas directamente al vacío (figura II.24).

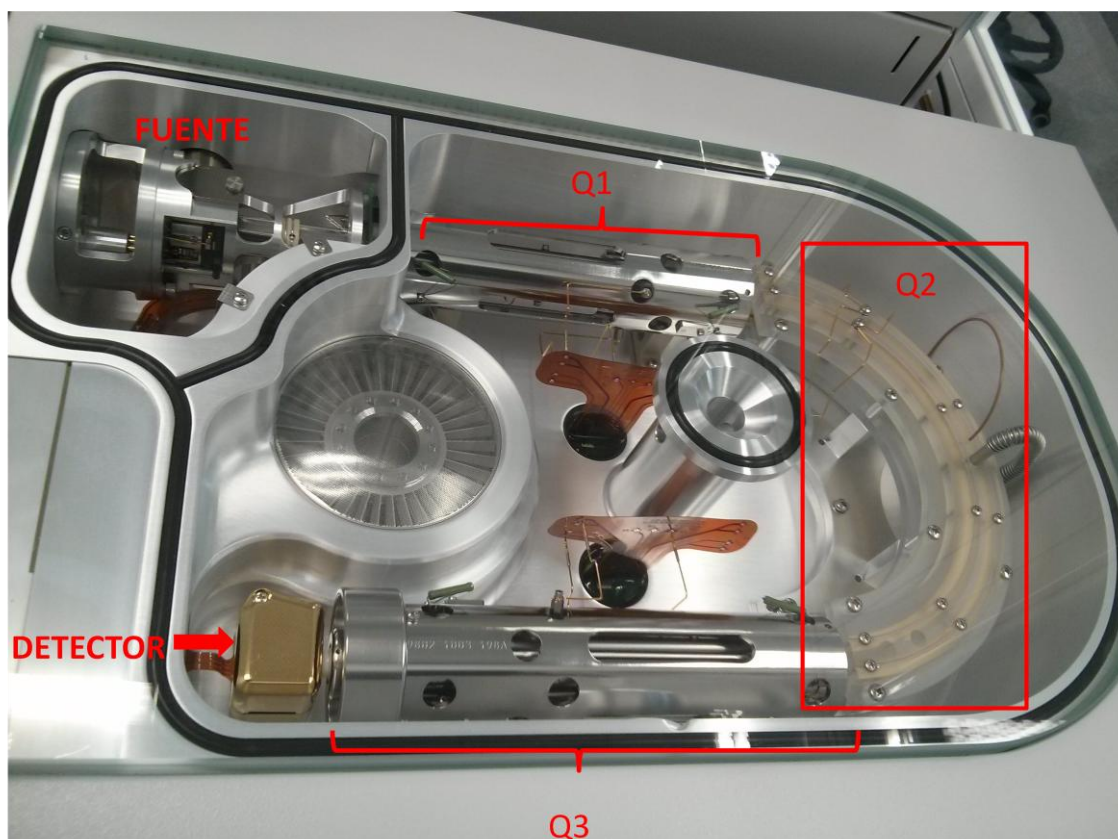


Figura II.24. Imagen del interior del detector de MSMS Bruker 320.

4.1.5. Detector de masas/masas

El detector de espectrometría de masa triple cuadrupolo marca: Bruker modelo: 320-MS (figura II.25) trabaja en un rango de masas entre 10 - 800 u. Control independiente de la temperatura del analizador: 30-50 °C. La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas es una técnica muy potente para el análisis de compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles, y se puede identificar y cuantificar compuestos con gran precisión.

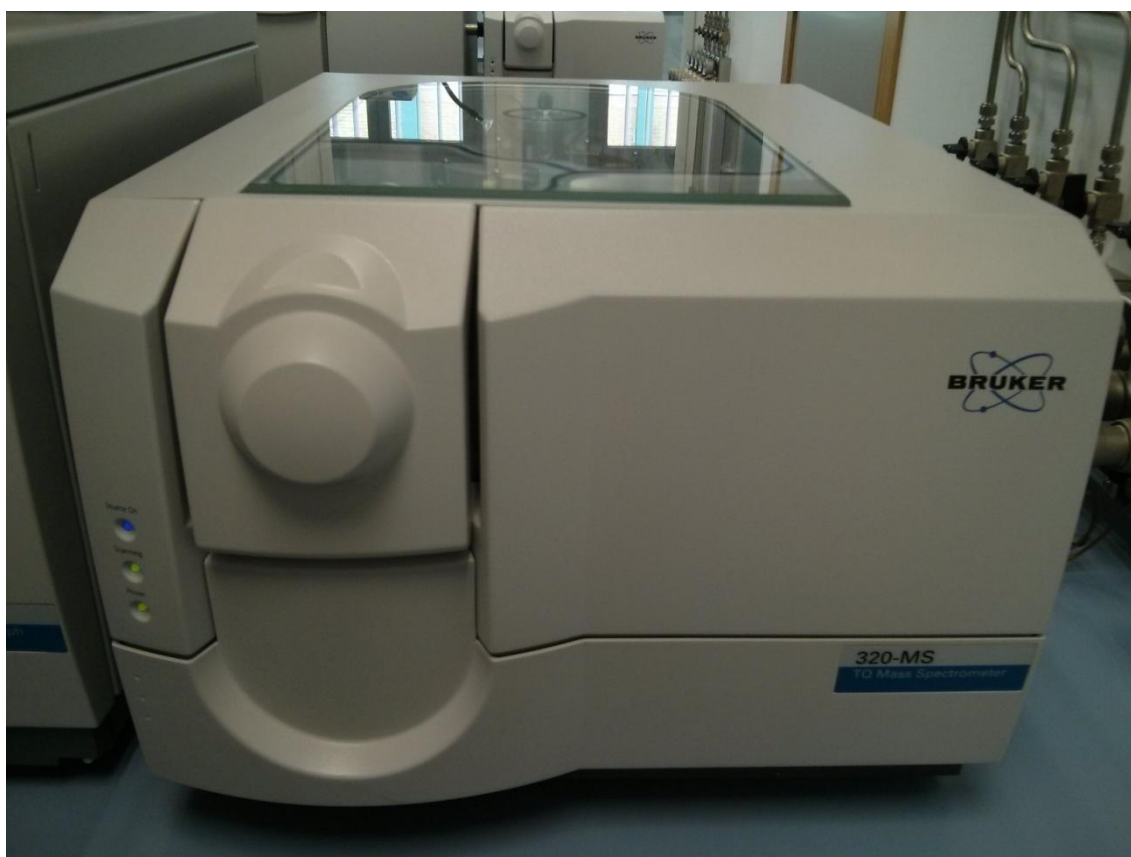


Figura II.25. Imagen del detector de espectrometría de masa triplecuadrupolo.

Los compuestos que llegan a la fuente después de su separación en columna, se produce la primera rotura en la fuente mediante impacto electrónico, obteniéndose los iones precursores característico del compuesto, siendo estos seleccionados en el primer cuadrupolo (Q1) (figura II.24).

En el segundo cuadrupolo (Q2), que es una celda de colisión circular (180°C) de largo recorrido para eliminación de especies neutras y ruido de

fondo en el proceso de colisión del gas, permitiendo una alta eficacia de disociación y amplio rango de energías operando en MS/MS. Se produce la segunda rotura de los iones precursores por su impacto con una corriente de argón, obteniéndose los iones productos, que serán seleccionados y transportados, por el tercer cuadrupolo (Q3) hasta la llegada al detector. El espectro de masa es característico de cada compuesto, y al trabajar en MSMS, se obtienen una gran selectividad y sensibilidad en el método al no tener prácticamente ruido en el cromatograma.

Los modos de operación de las masas disponibles son:

- Barrido de masas "Full Scan"
- Masas Concretas "SIM"
- Masas/Masas "MRM" o "MSMS"

4.2. Identificación de los compuestos

Se procedió a la identificación de los compuestos individualmente, para ello se preparó una disolución de cada uno de ellos en metanol, y se observó donde aparecía el pico correspondiente a ese compuesto, cada pico cromatográfico tiene asociado su espectro de masas. Comparando con la librería NIST, los espectros de masas de cada uno de ellos y comprobando su identificación, se anotó su correspondiente tiempo de retención. Se comprobó que el orden de los picos no era igual en diferentes columnas como es de esperar. Esto se realizó usando inyección líquida directamente, para que ningún parámetro más pueda afectar. Se ajustó la rampa de temperatura de columna para que los compuestos se separaran correctamente. La optimización de estos parámetros y otros, se detallan en el capítulo siguiente.

El espectro de masas de cada compuesto se puede observar en las figuras II.26 hasta la figura III.30, donde se pueden ver sus iones característicos, esas figuras pertenecen a la librería espectral NIST.

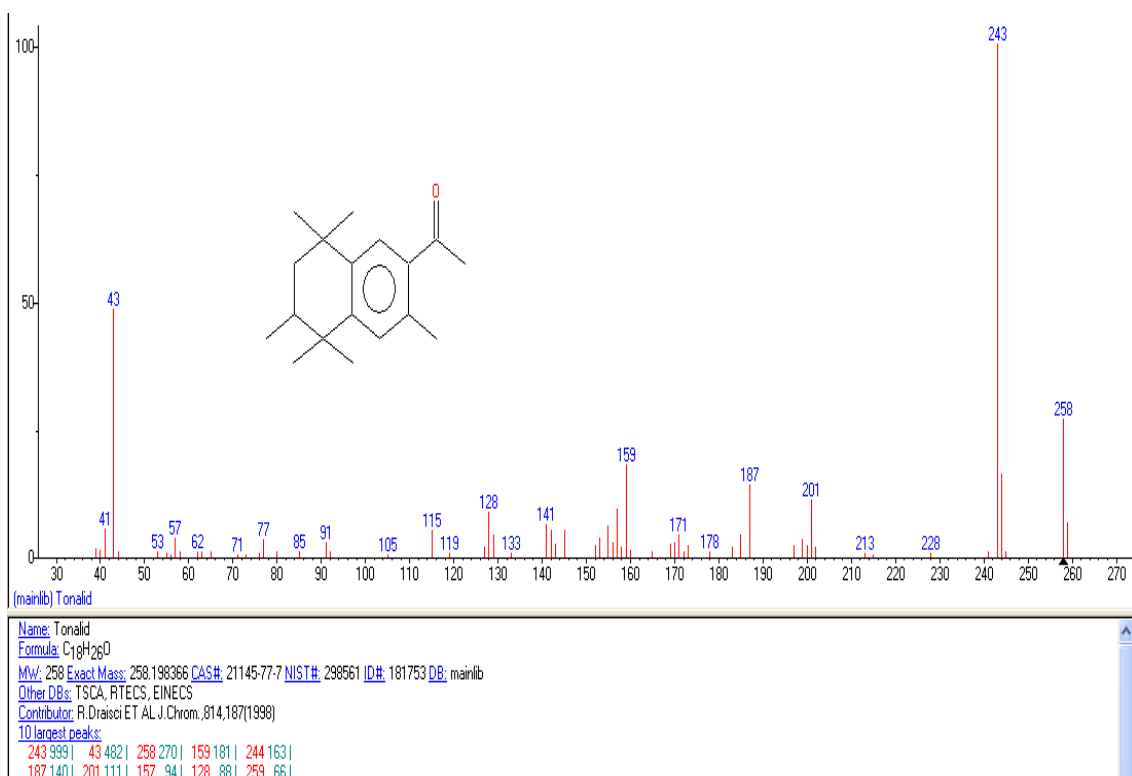


Figura II.26. Formula de Tonalide y espectro de masas.

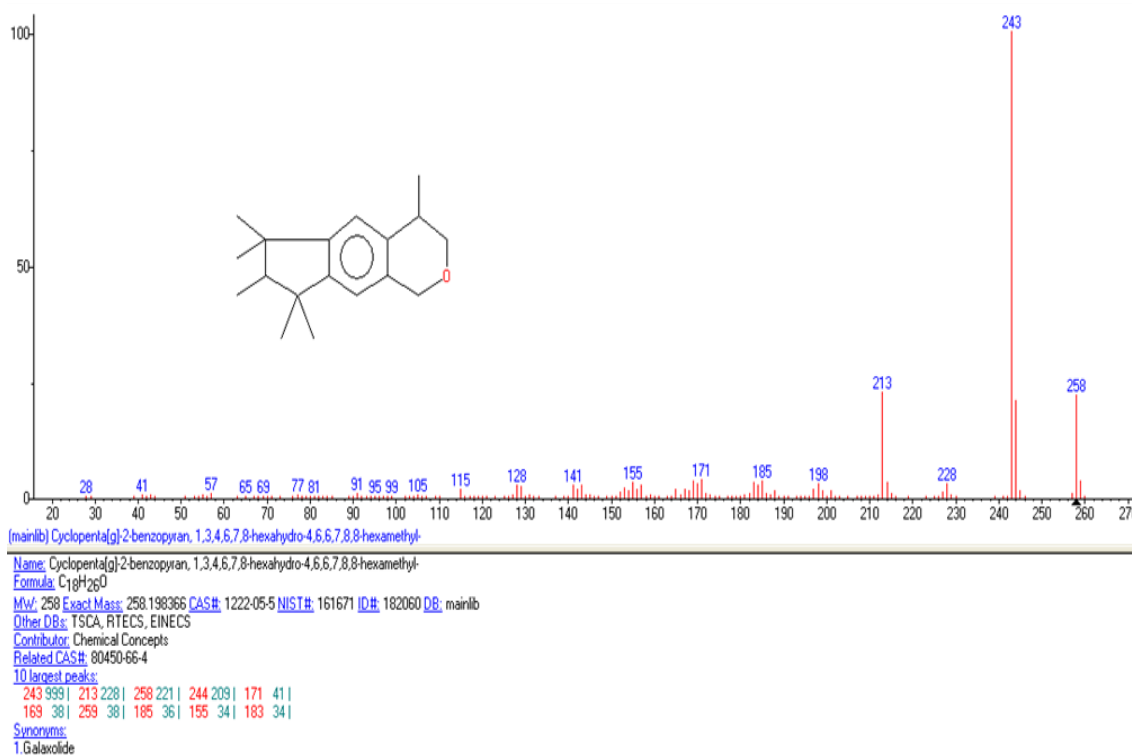


Figura II.27. Formula de Galaxolide y espectro de masas.

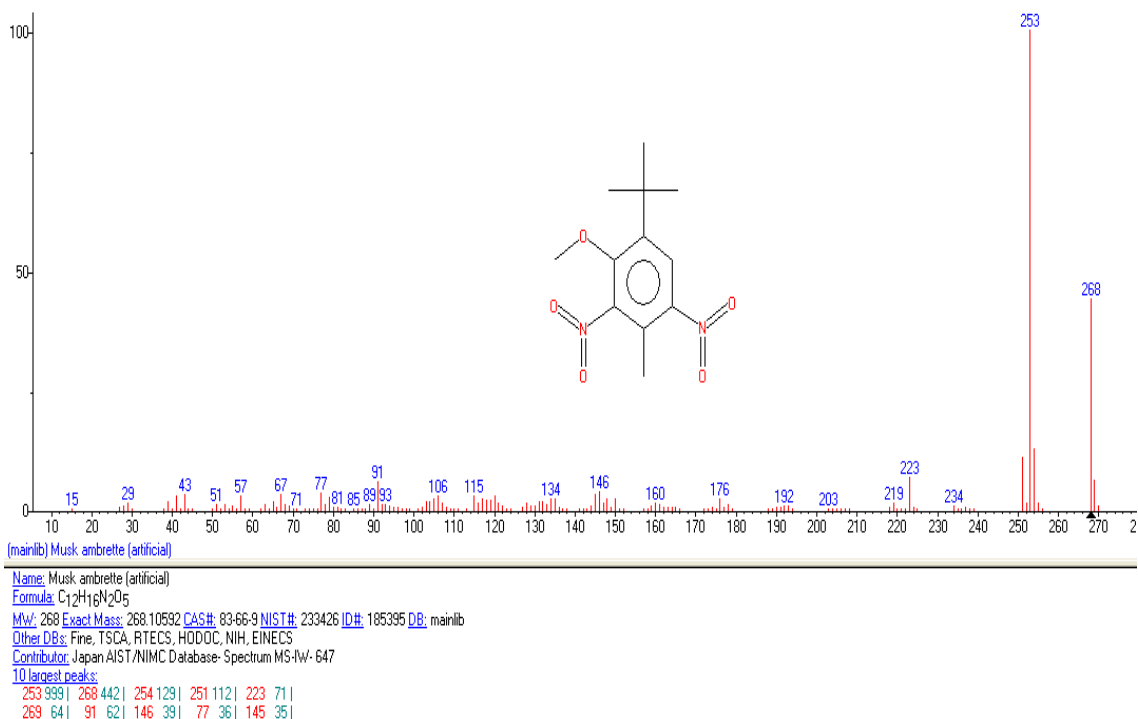


Figura II.28 Formula de almizcle ambreta y espectro de masas.

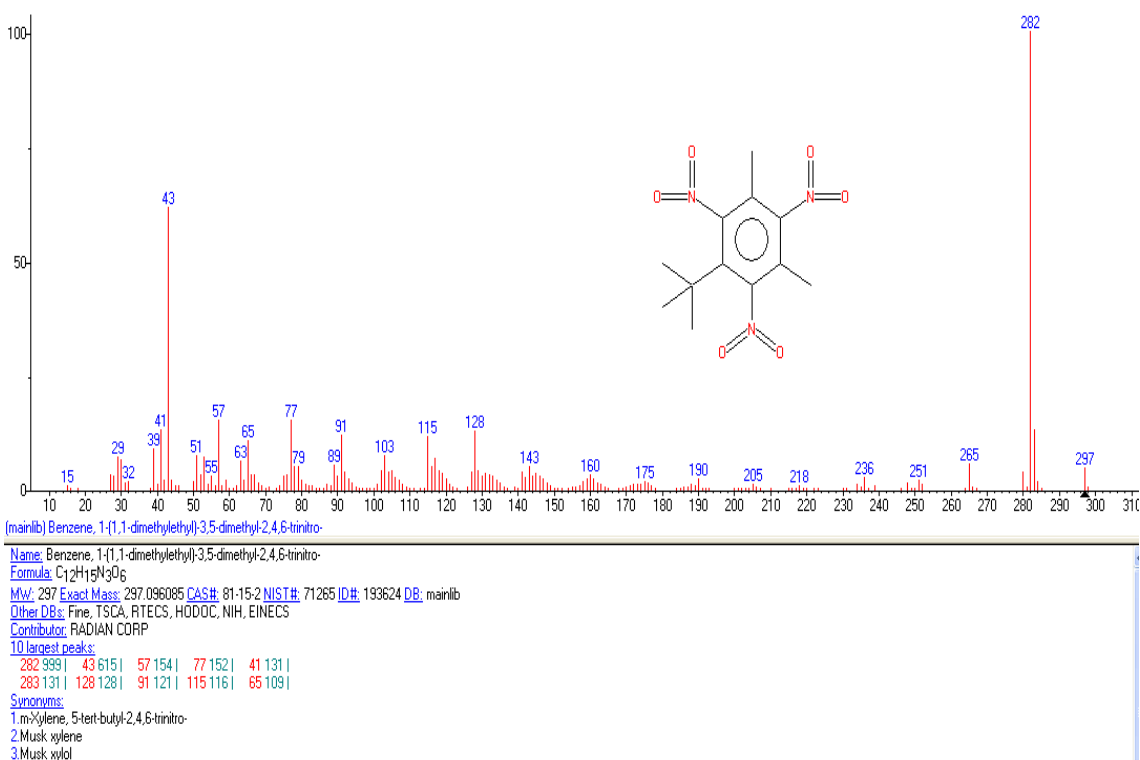


Figura II.29 Formula de almizcle xileno y espectro de masas.

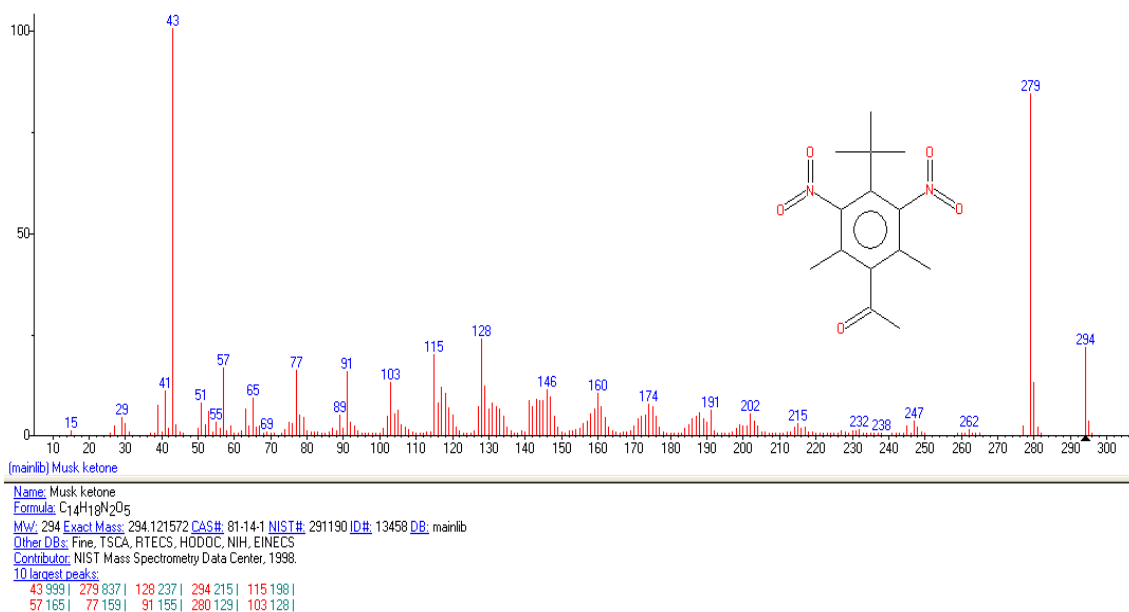


Figura II.30. Formula de almizcle cetona y espectro de masas.

4.3. Modos de trabajo en el detector

En la mayoría de la bibliografía consultada, el detector utilizado es un espectrómetro de masa con un único cuádruplo, donde se puede trabajar haciendo un barrido de masas en un rango concreto (FULL SCAN) o eligiendo el o los iones precursores de cada compuesto (SIM). El detector utilizado en este proyecto es un espectrómetro de masas también pero con triple cuádrupolo, el cual aporta las formas de trabajo de un simple cuádrupolo, mas la oportunidad de romper el ión precursor y obtener los iones hijos de cada compuesto, siendo estas transiciones selectivas de cada compuesto. Con ello se aumenta la sensibilidad y selectividad, de los compuestos estudiados. Todos los parámetros que afectan en el desarrollo del método hasta llegar a masas-masas, se desarrolla con detalle en el capítulo III de optimización.

4.4. Cálculo de resultados

Para el análisis cuantitativo se trabajó con el área de pico, que es proporcional a la cantidad de analito extraído y el procedimiento de calibración

externa. Se realizó una recta de calibrado con ocho puntos de calibración en un rango de trabajo entre 2 - 250 ng/L para tonalide y Galaxolide, mientras que para los nitroalmizcles de 25 - 250 ng/L. La cuantificación se realiza por interpolación del área del analito en la recta de calibrado correspondiente.

5. Procedimiento para el análisis de fragancias en muestras de aguas

Tras el procedimiento de optimización que se realiza en el capítulo III y se valido en el capítulo IV, el procedimiento final para el análisis de fragancias en muestras de aguas es el siguiente.

5.1. Condiciones generales

En este apartado se comentan condiciones de configuración del equipo: El cromatógrafo de gases utiliza como gas portador Helio y el gas Argón para la rotura de las masas en el segundo cuadrupolo (Q2). La configuración de la fibra se ajusto a una profundidad de 22 mm, desde la boca del vial. La bandeja del automuestreador seleccionada fue la de 8 x 4 posiciones, especial para viales de 20 ml de espacio en cabeza.

5.2. Pretratamiento de la muestra

Se pipetea 10 ml de la muestra en cada vial de espacio en cabeza de 20 ml, en el cual se ha pesado con anterioridad 2 gramos de NaCl p.a., Se cierre con tapón de aluminio con septum. No agitar el vial.

5.3. Parámetros del automuestreador

Las muestras se colocan en la bandeja del automuestreador desde las cual van a ser llevadas a un bloque calefactor a 100 °C, donde se produce la agitación de la muestra a 500 rpm durante 2 min. A continuación se calienta la muestra a 100 °C durante 30 min, donde se produce el proceso de extracción de la fibra de color azul (PDMS/DVB, de 65 µm de grosor). Una vez terminado el proceso de extracción se produce la desorción de la fibra en el inyector,

durante 10 min a 250 °C. Para que empiece la extracción de la siguiente muestra se puso un ciclo de 33 min.

5.4. Condiciones cromatográficas

En un Cromatógrafo de gases BRUKER 450, se produce la separación de los compuestos en una columna BR-sWax (FS 30m, 0.25 mm ID, 0.25 µm DF). El inyector se mantiene a una temperatura constante de 250 °C, durante 10 min de los cuales, los primero 5 min esta en splitless y a partir de ese tiempo se pone en split (1/100) hasta los 10 min, donde se produce la limpieza de la fibra. La muestra es arrastrada por la columna, a un flujo de 1 mL/min. Se siguió la rampa de temperatura del horno, que empieza a 60°C manteniéndose durante 5 min, concentrando los compuestos en cabeza de columna. La temperatura sube a 25 °C/min hasta 140 °C, y a 10 °C/min hasta 235°C, manteniendo esta temperatura 4 min, se sube la temperatura a 25 °C/min hasta 250 °C dejando esta temperatura durante 2 min, esto hace un total de 24,30 min de rampa en el horno. Desde la columna pasa a la línea de transferencia que esta a una temperatura de 250 °C y de ahí al detector donde la fuente se encuentra a una temperatura de 270 °C.

5.5. Condiciones del detector

Los parámetros del detector seleccionados fueron: empezar a adquirir el cromatograma a los 5 min, hasta los 24,5 min. Scan time: 0.392 sg; CID gas: on (es abierto el gas de colisión argón en Q2); La captura de pico se realizo en centroid; El detector en modo EDR, con Quad 1= 2.5 y Quad 3= 1.5, con una anchura a mitad de pico de 0.70 uma. Las transiciones elegidas para cada compuesto y sus voltajes se indican, en la tabla II.2.

Tabla II.2. Transiciones y voltajes de las fragancias.

Compuestos	Q1	Q3	Energía de colisión (V)
Galaxolide	243	143	25
	243	213	10
Galaxolide-Tonalide	258	243	10

Compuestos	Q1	Q3	Energía de colisión (V)
Tonalide	243	159	15
	243	187	10
Almizcle ambreta	253	91	25
	253	106	15
	268	243	10
Almizcle cetona	279	117	25
	279	118	25
	279	191	10
Almizcle xileno	282	77	30
	282	91	20
	282	117	20

6. Materiales y reactivos utilizados

Se describe a continuación todos los patrones, reactivos, materiales e instrumentación auxiliar utilizada en esta tesis doctoral.

6.1. Patrones y reactivos

6.1.1. Patrones de referencia

Se utilizaron patrones certificados de 10 mg/L de tonalide (98,5% de pureza), galaxolide (55,8% de pureza), almizcle ambreta (99,0% de pureza), almizcle cetona (98,0% de pureza) y almizcle xileno (99,0% de pureza), de la marca Dr. Ehrenstorfer suministrado por Scharlau (ver certificados en el ANEXO A).

6.1.2. Reactivos, disolventes y gases

Los reactivos fueron adquiridos en diferentes casas comerciales Scharlau o VWR:

- Cloruro sódico, calidad para análisis con 99,5% pureza (ref.: 27810.262), recipiente de 500 g. Casa comercial: VWR.
- Agua desionizada, Tipo I.

- Helio, pureza: 99,9992 %
- Argón, pureza: 99,9992 %
- Nitrógeno, pureza: 99,9997 %
- Tolueno, para análisis de ultratrazas por GC, (ref.: TO00752500), cantidad: 2,5 L. Casas comercial: Scharlab.
- Acetona, para análisis de residuos por GC, (ref.: AC03091000) cantidad: 1L. Casas comercial: Scharlab.
- Metanol, para análisis de ultratrazas por GC (ref.: ME03191000) cantidad: 1L. Casas comercial: Scharlab.
- n-Hexano, 96%, para análisis de ultratrazas por (ref.: HE03291000) cantidad: 1L. Casas comercial: Scharlab.
- Acetato de etilo, para análisis de residuos por GC (ref.: AC101491000) cantidad: 1L. Casas comercial: Scharlab.
- Ácido clorhídrico, 37%, Ultratrace®, para análisis de trazas ($\mu\text{g/L}$) (ref.: AC07611000) cantidad: 1L. Casas comercial: Scharlab.

6.2. Materiales e instrumentación

6.2.1. Material

- Espátula.
- Guantes de laboratorio
- Matraces aforados de vidrio, clase A (volumen: 5, 10, 25, 50, 100 y 500 mL)
- Tubos de centrifuga de polipropileno (15 mL).
- Botes de vidrio color topacio de 100, 250 y 500 mL con tapón de rosca.
- Embudos de decantación de vidrio (1000 mL).
- Probeta de vidrio (50 mL), clase A.

- Matraz Erlenmeyer de vidrio (100 mL).
- Micropipetas graduables de 10-100 μ L; 20-250 μ L y 100-1000 μ L.
- Pipetas aforada de vidrio ($5 \pm 0,015$ y $10 \pm 0,02$ mL), clase A.
- Pipetas graduadas de vidrio ($10 \pm 0,05$ mL), clase A.
- Pipetas Pasteur de vidrio
- Vasos de precipitados de vidrio (volumen: 50, 100, 250 y 500 mL)
- Viales de vidrio de 20 ml ámbar de espacio en cabeza con tapón de aluminio específicos para automuestreador CombiPal. (ref:V1318) Análisis Vínico.
- Septum tapones viales (20 ml) (ref.: 548-0867) VWR.
- Viales de vidrio de 1,5 mL de color topacio con tapón de rosca para cromatografía.
- Cartucho de extracción (Strata-X 33u Polimeric reversed phase 200mg/ 6 ml) Phenomenex
- Fibras Supelco, Polydimethylsiloxane / Divinylbenzene (PDMS/DVB), de color azul con 65 μ m de grosor. (ref. S57311) Análisis Vínico.
- Fibras Supelco, Carboxen/ Polydimethylsiloxane (Carboxen / PDMS), de color negro con 75 μ m de grosor. (ref. S57319) Análisis Vínico.
- Fibras Supelco, Polydimethylsiloxane (PDMS), de color rojo con 100 μ m de grosor, (ref. S57301) Análisis Vínico.
- Fibras Supelco, Polyacrylate, de color blanco con 85 μ m de grosor. (ref. S57294) Análisis Vínico.
- Fibras Supelco, Divinylbenzene / Carboxen / Polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS), de color gris con 50/30 μ m de grosor. (ref. S57329) Análisis Vínico.
- Liner split 1079 inyección líquida para CG (ref.: 392611945) Bruker
- Liner split 1079 LVI siltek con fritado para CG (ref: RT217092145) Bruker
- Liner SPME 1079 para CG (ref: 392611948) Bruker

- Septum Supelco, Molded thermogreen LB-2septa w/injection hole 11.5 mm 50 unidades (ref. AV 8010-0225) Análisis Vínico
- Columna VF-5 ms ((95%) Dimetil-(5%) difenilpolisiloxano) FS 30m, 0.25mm ID, 0.25µm DF.
- Columna BR-swax (CarbowxR polyethylene glycol) FS 30m, 0.25 mm ID, 0.25 µm DF.
- Imanes de agitación

6.2.2. Instrumentación auxiliar

- Balanza analítica marca SARTORIUS, modelo CP124S
- Microbalanza marca Sartorius modelo: ME36S
- pH-metro Marca: Crison Modelo: basic 20
- Conductímetro marca Hanna mod. HI 255
- Congelador
- Frigorífico
- Equipo de purificación de agua Milli-Q sistema Integral 3 (Millipore).
- Rotavapor. marca: IKA, modelo: RV 10 basic
- Placa de agitación marca: IKA, modelo: C-MAG HS 7
- Bomba de vacío, marca: vacuubrand, modelo: MZ2C NT
- Equipo de extracción en fase sólida consistente en cámara de vacío con tubos de teflón para la carga de altos volúmenes de muestra (Supelco).
Marca: Varían (12 posiciones)
- Sistema de evaporación manual por corriente de nitrógeno

7. Métodos de Control de Calidad de Equipos

En el presente apartado se describen los métodos de CC que se aplican durante la aplicación rutinaria del método, una vez optimizado y validado.

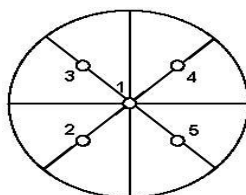
Además de la instrumentación analítica, se necesitan equipos auxiliares como son las micropipetas y la balanza analítica, para el método que se ha optimizado, con lo cual el buen funcionamiento de estos equipos se debe tener en consideración para minimizar los errores que puedan producirse en el análisis.

7.1. Calibración de balanza analítica

Las balanzas analíticas del laboratorio donde se desarrollo la parte experimental del método final validado, también se procede a su calibración interna diariamente y externa una vez al año con pesas certificadas.

Se realiza el cálculo de la excentricidad para los 5 puntos en los que se divide el plato de la balanza, ver figura II.32.

Figura II.32. Posiciones del plato de pesada circular de la balanza analítica



Se realizan 5 medidas en cada punto con una pesa certificada de 100 g, para calcular el error de excentricidad. Posteriormente se realiza diez pesadas con pesas certificadas de 0.02, 5, 20, 100 y 200g, en la zona central de la balanza que es la forma habitual de pesar. Comprobando si cumple la tolerancia indicada por el fabricante.

Se hace referencia a la verificación y/o calibración de estos equipos debido a que son los dos únicos instrumentos de laboratorio utilizados en la preparación de muestras independientes del CG/MS/MS. Para la preparación de patrones y muestras líquidas, y la pesada de los 2 gramos de NaCl en cada vial.

7.2. Calibración de micropipetas

En el laboratorio se realiza por rutina cada tres meses la verificación y/o ajuste de las micropipetas, realizando el siguiente procedimiento: se toman dos vasos de precipitado de 100 ml, cada uno de ellos llenos con un poco de agua. Uno de ellos se introduce en la balanza analítica y el otro se utiliza para pipetear. Se toman 12 medidas del rango más alto y más bajo de cada pipeta (ejemplo: 1-10 ml, se pipetearía 1 ml doce veces y 10 ml otras doce veces, de las cuales se eliminan los valores más altos y más bajo de esas medidas para cada rango). Los 10 valores que se han tomado como correctos se introducen en la página de verificación de micropipetas de la casa comercial de las mismas, apareciendo la imagen de la figura II.31. <http://info.thermoscientific.com/?elqPURLPage=372>

Figura II.31. Pagina de verificación de la calibración de pipetas

Temperatura: 21 °C

Presión del aire: 1013 hPa (mbar)

La pérdida por evaporación: 0 mg

Gama de pipetas: 1-10 ml

Número de serie: Kartell 1-10 ml

Número de canal: 1 (Solo con MCP)

los resultados de pesaje

	Mínimo	Máximo
1.	1002.3 mg	10005.2 mg
2.	1001.2 mg	10005.1 mg
3.	1000.6 mg	10007.1 mg
4.	1001.7 mg	10006.7 mg
5.	1000.3 mg	10005.9 mg
6.	1000.5 mg	10002.4 mg
7.	1000.4 mg	10003.5 mg
8.	1000.1 mg	10002.3 mg
9.	1000.2 mg	10009.1 mg
10.	1000.6 mg	10007.2 mg

		Volumen µL	Exactitud µL	%	Precisión sdµl	CV%	Incertidumbre µL	%
Z= 1.0031								
Mínimo:	Medido	1003.88	3.88	0.39	0.72	0.07	6.33	0.63
Passed	límite	1000	±60	±6	30	3	120	12
Máximo:	Medido	10036.47	36.47	0.36	2.22	0.02	40.91	0.41
Passed	límite	10000	±60	±0.6	30	0.3	120	1.2

Donde indica la exactitud, precisión e incertidumbre de cada pipeta, en el rango inferior y superior de trabajo, y si cumple con las especificaciones del fabricante (figura II.31). Consiguiendo la certeza de que las micropipetas están en perfectas condiciones para su uso.

7.3. Calibración y mantenimiento CG/MS/MS

El CG/MSMS, necesita una serie de revisiones periódicas para comprobar su buen estado y mantenimiento del equipo, como son:

- Diagnóstico de control electrónico, es un test mediante el cual el equipo chequea todo la electrónica del detector de MSMS.
- Comprobar filtros de humedad, el equipo lleva unos filtros externos por los que pasa el gas portador antes de la entrada al equipo, donde se va reteniendo la humedad que trae el Helio.
- Revisar los niveles de aceite de la bomba rotatoria y cambio de aceite, para que se produzca un buen vacío en el detector de MSMS.
- Comprobar voltaje del detector. El detector es un consumible con los cual, cuando llega a dos mil el voltaje se considera que está agotado. En estas comprobaciones el equipo va aumentando el voltaje del detector para poder mantener la señal de las masas que tiene de referencia.
- Autotune, es la calibración de las masas, se realiza cada vez que se cambian la temperatura de la línea de transferencia y/o la temperatura de la fuente, debido a que calibra las masas en las mismas condiciones de medida.
- Chequeo aire- agua, se hace antes de empezar a trabajar todos los días, para comprobar que no se tiene ni aire ni agua en el sistema, debido a que la presencia de alguno de ellos nos daría una pérdida de señal en el detector, suelen ser indicativos de una fuga en alguna parte del equipo, con lo cual si se fuga el gas portador también se puede perderse parte de la muestra. Suele venir provocado normalmente por una fuga en el inyector, por alguna férula que no está en buen estado o alguna tuerca poco apretada.

CAPITULO III:

OPTIMIZACIÓN Y PUESTA APUNTO

1. Introducción

El proceso de puesta a punto del método y optimización se empezó estudiando la extracción de estos compuestos de la matriz en la que se encuentran retenidos, que en este caso es acuosa. Para ello se realizaron diferentes ensayos preliminares con distintos procesos de extracción como sería: líquido-líquido, SPE y SPME, descritos con detalle en el capítulo II, tomando como muestra de partida agua desionizada dopada con una cantidad conocida de los cinco compuestos objeto de esta tesis.

Una vez seleccionado el proceso de extracción más eficiente para los compuestos, se procedió a la optimización de todas las variables que influyesen en la sensibilidad y selectividad de la determinación de los mismos. En el caso de la SPME, que fue el método seleccionado se estudiaron los siguientes parámetros:

- Elección de la fibra
- Efecto de la adición de NaCl
- Volumen de muestra en el vial
- Tiempo de incubación
- Temperatura de incubación
- Tiempo de desorción de la fibra
- Efecto del pH

Además de la elección del método de extracción de los compuestos, también se optimiza el procedimiento cromatográfico y los parámetros de detección de los almizcles, como son:

- Introducción de muestra
- Inyector
- Separación cromatográfica
- Detección

2. Ensayos preliminares

En este apartado se van a evaluar cada uno de los procesos de extracción realizados y sus correspondientes recuperaciones.

2.1. Evaluación de las extracciones Líquido-Líquido (LLE)

Se realizaron dos extracciones diferentes en tolueno y en n- hexano, los % de recuperación en ambas se pueden observar en las tablas III.1 y III.2, respectivamente.

A) Tolueno

La extracción con tolueno (Beste et al., 2008) se llevo a cabo tres días diferentes, realizando el procedimiento por triplicado. Es un procedimiento sencillo, aunque presenta valores de RSD mayores a una extracción líquido-líquido tradicional realizada con embudos de decantación y más pasos (ello conlleva mayor manipulación de la muestra y podría incrementar el número de desviaciones en los resultados). Los resultados del primer día se descartaron al ser las recuperaciones demasiado bajas.

Se realizo una recta de calibrado de estos compuestos en tolueno, para comprobar tanto su linealidad como su respuesta cromatográfica. Se observa que la forma de los picos en el cromatograma es más irregular y presentan menor intensidad que en n-hexano. Esto afecta al límite de detección. En la recta en tolueno se empiezan a detectar los picos en 10 ppb, con lo cual su límite de detección es mayor que usando otros disolventes.

Tabla III.1. Porcentajes de recuperación realizando extracción en Tolueno

Muestras (% recuperación)	Almizcles Ambreta	Almizcles cetona	Almizcles xileno	Galaxolide	Tonalide
1.1	59	102	47	89	48
1.2	52	106	48	84	45

Muestras (% recuperación)	Almizcles Ambreta	Almizcles cetona	Almizcles xileno	Galaxolide	Tonalide
1.3	53	98	48	83	40
2.1	74	150	73	93	107
2.2	63	149	64	94	108
2.3	63	145	57	90	99
Media (%)	61	125	56	89	75
RSD (%)	13,1	20,3	18,7	5,2	44,6

Los resultados en tolueno (tabla III.1) son aceptables, obteniendo recuperaciones entre un 83-90 % y reproducibles con RSD inferiores a 6 % para el galaxolide exclusivamente, pero no para el resto de los compuestos.

B) n- Hexano

Los resultados obtenidos para la extracción en n-hexano (Kupper et al., 2006; Gomeza et al., 2009; Yan et al., 2010; Claraa et al., 2011; Martínez et al., 2012) con la metodología optimizando el volumen de hexano, para que favorezca el paso de los compuestos al disolvente, da buenos porcentajes de recuperación medios entre un 82 y 107 %, para todos los compuestos excepto para el Almizcle ambreta, en el que se recupera aproximadamente el 50 %. Los resultados obtenidos en las tres extracciones tienen RSD entre el 5,7 - 20,7 %.

Tabla III.2. Porcentajes de recuperación realizando extracción en n-Hexano

Muestras (% recuperación)	Almizcles ambreta	Almizcles cetona	Almizcles xileno	Galaxolide	Tonalide
1.1	--	87	73	84	92
1.2	--	83	77	82	92
1.3	--	85	102	78	89
2.1	41	84	65	110	84
2.2	42	84	63	109	81
2.3	44	82	74	107	80
3.1	75	72	105	139	104
3.2	44	82	94	130	100
3.3	51	77	105	127	101
Media (%)	50	82	84	107	91
RSD	26,2	5,7	20,6	20,7	9,5

Se podría concluir que la extracción líquido- líquido, es mejor en n-hexano que en tolueno, aunque no es óptima en ninguno de los dos casos para el conjunto de compuestos seleccionados en este trabajo.

2.2. Evaluación de la extracción en fase sólida (SPE)

Para el proceso de extracción en SPE (Osemwengie and Steinberg, 2001; Berset et al., 2004; Ternes et al., 2007; Reif et al, 2008) se modificaron o comprobaron experimentalmente algunos parámetros del procedimiento descrito en la bibliografía, quedando la metodología de extracción como se ha descrito en el capítulo II y que se pasa a comentar en este apartado. Se partió de medio litro de agua miliQ, en la cual se ha añadido 50 µl de patrones de 1 ppm en acetona.

Se hicieron pruebas de omitir el paso de elución con acetato de etilo, con el objetivo de no mezclar dos disolventes, incrementando el volumen de n-hexano. Se observó que los resultados obtenidos son peores, no extrayéndose todos los compuestos de los cartuchos. Después de recluir los cartuchos, el galaxolide seguía en parte retenido en el mismo, mientras el resto de compuesto se habían perdido. Se concluye que no se puede omitir la elución de los compuestos con acetato de etilo, siendo un paso clave.

También se incluye en el proceso el paso del aire a través del cartucho antes de ser secado con nitrógeno líquido, obteniendo un mejor secado del cartucho y facilitando la elución por gravedad del paso posterior.

Para las extracciones mediante SPE, los valores de recuperación son similares para todos los compuestos estudiados y los RSD obtenidos son inferiores a 7 en todos los casos, como se puede observar en la tabla III.3.

Tabla III.3. Porcentajes de recuperación realizando SPE

Recuperación (%)	Almizcles Ambreta	Almizcles cetona	Almizcles xileno	Galaxolide	Tonalide
1.1	86	96	83	108	88
1.2	86	85	90	92	94
1.3	93	82	99	102	89
2.1	99	97	98	101	93
2.2	96	98	97	102	92
2.3	97	100	95	108	90
3.1	85	90	97	106	95
3.2	84	97	97	96	93
3.3	82	89	83	110	93
Media	89,1	92,4	93,1	102,7	91,7
RSD	6,93	6,69	6,43	5,99	2,25

De los ensayos anteriores, se concluye que este proceso de extracción si sería adecuado para el estudio de los almizcles seleccionados.

2.3. Evaluación de la microextracción en fase sólida (SPME)

En SPME, la forma de evaluar la recuperación no es como en los procesos anteriores, es decir, dopando agua desionizada con patrones para comprobar su recuperación. En este caso se hace un proceso equivalente a la preparación de los puntos de calibración para este proceso de extracción. Se evalúa si la fibra extrae los compuestos de estudio, realizando el procedimiento de SPME (Ternesa et al., 2003; Suarez et al., 2009) y comprobando que los compuestos son identificados en el cromatograma.

Se observo que todos los compuestos eran extraídos, en las distintas fibras utilizadas, excepto en la fibra de color blanco que no se obtenía respuesta de ninguno de ellos, y se descarto. En la tabla III.4 se pueden observar los valores de área dependiendo del tipo de fibra, a diferentes concentraciones de patrones.

Tabla III.4. Intensidades de los patrones para las diferentes fibras

Comparación intensidades de calibración		Área (cuentas)			
Compuesto	Concentración (ppb)	comparación fibras (SPME)			
		Fibra Negra	Fibra roja	Fibra Gris	Fibra azul
Almizcle ambreta	0,1	*	*	*	1547
	1	6264	3845	3487	16762
	10	63328	38244	104564	211121
	100	3,12E+05	1,92E+05	8,40E+05	9,51E+05
Almizcle cetona	0,1	5097	1355	679	2556
	1	10872	16710	12447	28458
	10	181652	152416	277154	370849
	100	6,36E+05	4,22E+05	1,12E+06	1,61E+06
Almizcle xileno	0,1	*	*	*	818
	1	3426	2341	1450	10162
	10	58018	25135	81372	125191
	100	2,58E+05	1,25E+05	5,02E+05	5,79E+05
Galaxolide 1	0,1	12461	1988	1422	6167
	1	24721	18792	7495	43549
	10	283045	206184	332502	477513
	100	1,48E+06	1,22E+06	2,04E+06	2,60E+06
Galaxolide 2	0,1	11933	1707	1158	5584
	1	21682	17600	6801	39470
	10	252170	182819	299982	433454
	100	1,30E+06	1,07E+06	1,82E+06	2,30E+06
Tonalide	0,1	26785	5057	829	16852
	1	61759	63877	26080	209988
	10	1,13E+06	6,56E+05	1,74E+06	2,65E+06
	100	6,18E+06	3,45E+06	1,10E+07	1,36E+07

Se observa en primer lugar que para algunos compuestos en el nivel más bajo de concentración (0,1 µg/L), tiene mejor respuesta la fibra negra. Se empezó a hacer pruebas a concentraciones más bajas con esta fibra, comprobando que los valores son más altos a concentraciones cada vez más bajas, debido a que la fibra no desorbe completamente los compuestos. Entonces ese aumento de área viene provocado por un efecto memoria, no pudiendo eliminarse para bajas concentraciones, ni con el acondicionamiento de la fibra, con lo cual fue descartada como opción.

Se representan los valores de la tabla III.4 en gráficos de barras (figura III.1), donde en el eje X, se representan las concentraciones medidas en $\mu\text{g/L}$ y en el eje Y, los valores de área en tanto por ciento. Cada color representa al color de la fibra utilizado. El porcentaje normalizado se calcula, sumando las respuestas de todas las fibras, tomando ese valor como 100 %, y calculando la contribución de cada una de ellas que constituye ese porcentaje.

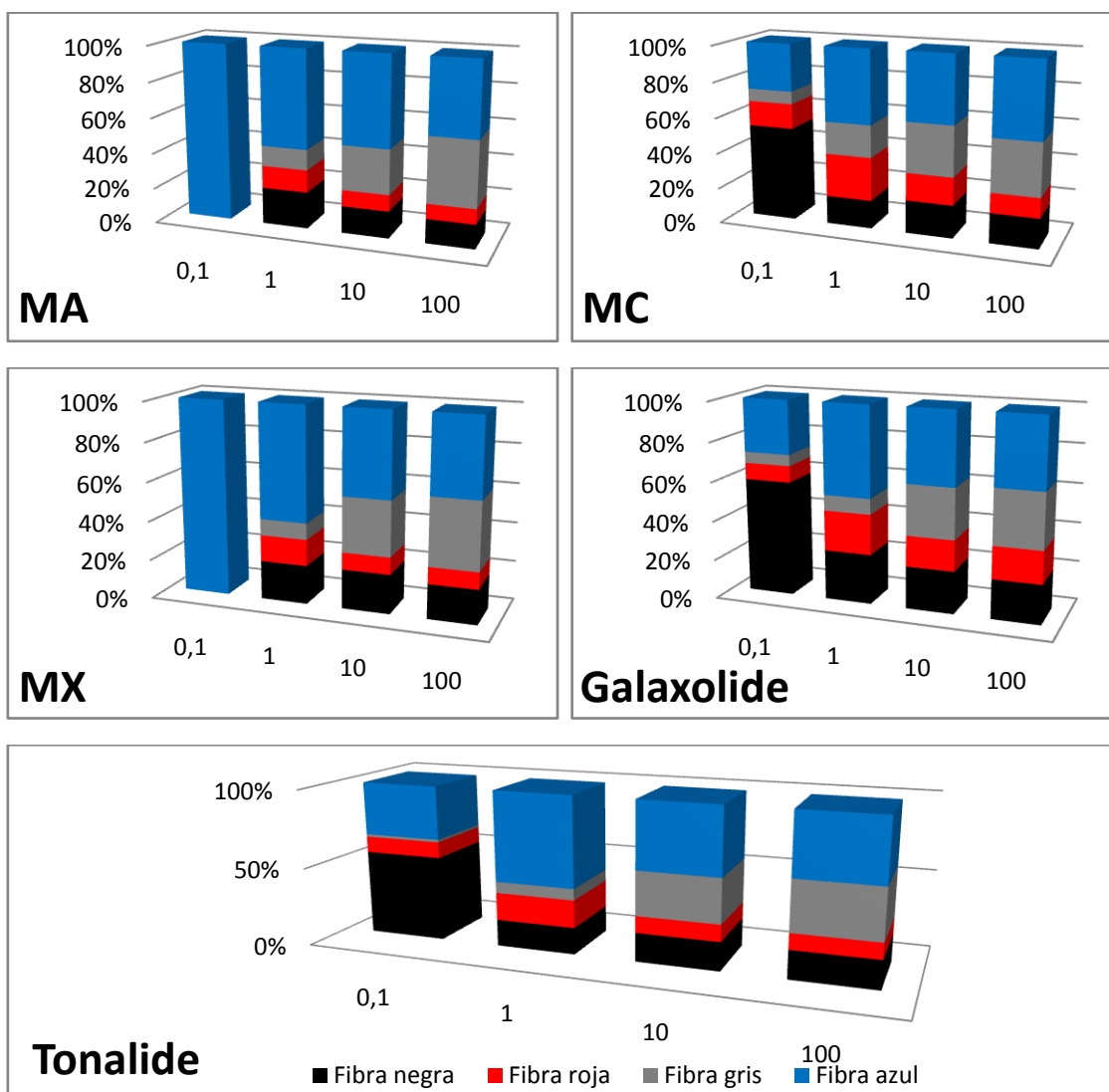


Figura III.1. Graficas comparativas de la capacidad de adsorción de cada fibra para cada almizcle, en las diferentes concentraciones en $\mu\text{g/L}$.

En conclusión, la fibra azul es más sensible para los almizcles y permite límites de detección de ng/L en todos los compuestos.

Las recuperaciones sobre muestras reales se pueden ver en el capítulo IV de validación.

2.4. Comparación entre las diferentes métodos de extracción

Teniendo en consideración los resultados obtenidos para las extracciones líquido-líquido, extracción en fase sólida y microextracción en fase sólida, para las cinco fragancias estudiadas en este proyecto, se sacan las siguientes conclusiones.

Se descartaría la extracción líquido- líquido debido a que no es igual de eficaz para todos los compuestos, lo cual, obligaría a hacer dos extracciones diferentes en función del compuesto que se quiera detectar.

La extracción en fase sólida obtiene valores de recuperación para todos los compuesto entre un 89 y un 102%, sería un método totalmente valido para las fragancias indicadas.

Para terminar, se han preparado concentraciones de patrones iguales para inyectar en SPME y en inyección líquida LVI (que sería la forma de calibrar tanto para SPE como para LLE), para poder comparar la respuesta del equipo frente a estas dos formas de extracción (tabla III.5)

Tabla III.5. Comparativa entre las tres técnica de extracción.

Comparación intensidades de calibración		Área (cuentas)	
Compuestos	Concentración (µg/L)	SPME	LLE ó SPE
Almizcle ambreta	0,1	1547	*
	1	16762	891
	10	211121	6116
	100	9,51E+05	44033
Almizcle cetona	0,1	2556	*
	1	28458	1704
	10	370849	15460
	100	1,61E+06	112250

Comparación intensidades de calibración		Área (cuentas)	
Compuestos	Concentración ($\mu\text{g/L}$)	SPME	LLE ó SPE
Almizcle xileno	0,1	818	*
	1	10162	477
	10	125191	2095
	100	5,79E+05	23066
Galaxolide 1	0,1	6167	3793
	1	43549	5392
	10	477513	20605
	100	2,60E+06	119858
Galaxolide 2	0,1	5584	3948
	1	39470	5026
	10	433454	18952
	100	2,30E+06	108893
Tonalide	0,1	16852	2735
	1	209988	6895
	10	2,65E+06	42229
	100	1,36E+07	296669

Los resultados obtenidos en SPME para concentraciones bajas son mejores para todos los compuestos que en inyección líquida, pudiéndose ver concentraciones de ng/L para todas las fragancias, llegando a $\mu\text{g/L}$ para poder ser detectadas en muestra a través de inyección líquida en el caso de los Almizcles, como se puede ver en la tabla III.5.

De los resultados obtenidos en estos ensayos preliminares se concluye que la microextracción en fase sólida (SPME) es la técnica escogida, debido a que se obtiene una mejor respuesta en el equipo y ello indica menores límites de detección para todos los almizcles. Esta técnica de extracción también conlleva menos manipulación de muestra por parte del operador, sin uso de disolventes (disminuyendo los vertidos al medioambiente y reduciendo las exposiciones del trabajador), obteniendo un procedimiento más automatizado para poder trabajar como método de rutina.

3. Optimización de la preparación de muestras mediante SPME

Una vez seleccionada la fibra se procede a la optimización del resto de los parámetros de extracción del método.

Se han optimizado los siguientes parámetros, solo cambiando los parámetros indicados y dejando el resto igual para todos los casos:

- Efecto de la adición de NaCl
- Volumen de muestra en el vial
- Tiempo de incubación
- Temperatura de incubación
- Tiempo de desorción de la fibra
- Efecto del pH

3.1. Efecto de la adición de NaCl

Se observa que los compuestos MA, MC y MX, tienen comportamientos menos sensibles a su detección que el galaxolide y el tonalide. Para poder favorecer el pasos de estos compuestos a la fibra, se realizan pruebas de extracción tanto en patrones como en muestras en presencia de sal (NaCl). Para ello, se compara usando un patrón de 100 ng/L, en 10 ml de agua desionizada.

Se realizan los siguientes ensayos:

1º.- sin añadir sal;

2º.- añadiendo un gramo de sal;

3º.- añadiendo dos gramos de sal y por último,

4º.- añadiendo 3 gramos de sal.

Tabla III.6. Resultados de la respuesta área (cuentas) del equipo al añadir sal a las muestras.

Inyecciones	MA	MC	MX	HHCB 1	HHCB 2	AHTN
Muestra 0 g sal	0	24771	196	3,10E+06	2,81E+06	620532
Muestra 1 g sal	1563	36864	1317	1,98E+06	1,81E+06	431830
Muestra 2 g sal	16627	54703	8600	1,23E+06	1,13E+06	341113
Muestra 3 g sal	0	35300	189	1,53E+06	1,42E+06	327346
Patrón 0 g sal	4600	17695	1639	14629	13602	25459
Patrón 1 g sal	6813	40607	1792	14299	12448	24329
Patrón 2 g sal	8182	68013	1645	18374	16140	26475
Patrón 3 g sal	5353	66752	590	11937	10878	17305

Los valores de la tabla III.6 se representan en las gráficas III.2 y III.3 para patrones y muestras respectivamente. Donde los valores del porcentaje normalizado se realizan sumando las respuestas de cada analito con las distintas adicciones de sal, considerando este valor el 100% y calculando la aportación a este porcentaje de cada experiencia.

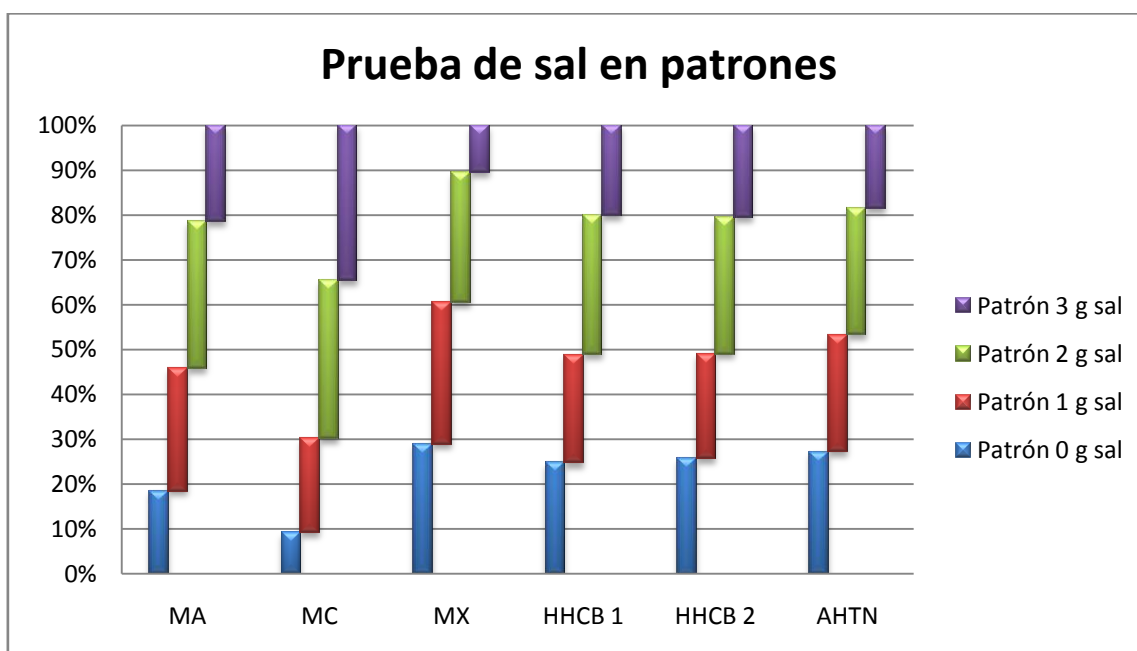


Figura III.2. Gráfica que representa el porcentaje de respuesta normalizado añadiendo diferentes cantidades de sal para cada compuesto, prueba sobre patrones.

Se obtiene que la adición de dos gramos de sal favorece la extracción de MA, MC y MX, tanto en patrones como en muestras de aguas residual (que podrían ser las que presentaran mayores interferencias), no siendo significativo este efecto para el galaxolide (HHCB) y tonalide (AHTN). Los valores de la tabla III.6 (figuras III.2 y III.3) corresponde con las respuestas de área para cada compuesto (%).

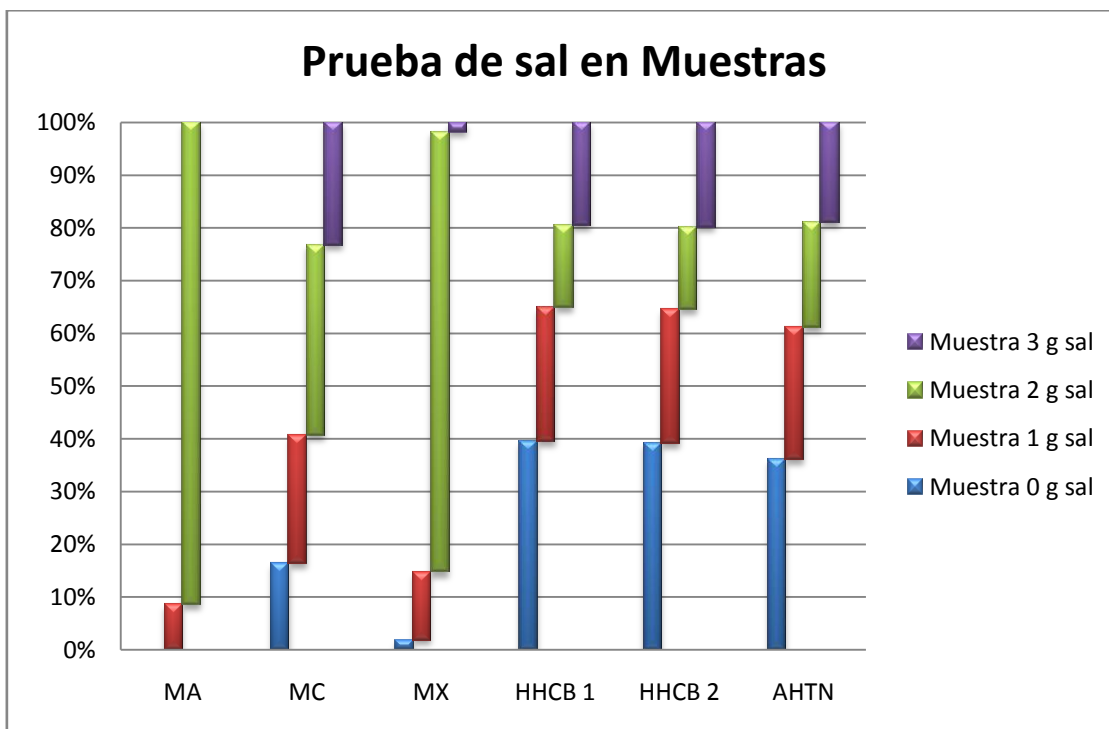


Figura III.3. Grafica que representa el porcentaje de respuesta normalizado añadiendo diferentes cantidades de sal para cada compuesto, prueba sobre muestras.

Con estos resultados tanto la preparación de las muestras como de patrones se realizara añadiendo dos gramos de sal al fondo de vial, no agitando hasta el momento de la extracción de la muestra por la fibra. En el caso de las muestras de agua de mar, se añadió la cantidad proporcional de sal para que en su contenido final en 10 mL, fuese de dos gramos como en el resto de las muestras. Teniendo en cuenta que el agua de mar, tiene un contenido teórico aproximado de 35 g/L, se peso para esta matriz de muestras 1,65 g de sal.

3.2. Volumen de muestra en el vial

El volumen de muestra tomado en el vial de espacio en cabeza, debería ser como máximo el volumen medio del vial donde se vaya a extraer. Al ser el vial de 20 ml se podría añadir 10 ml de muestra, aunque en algunos artículos de la bibliografía el volumen de muestra tomado es de 5 ml (Ternesa et al., 2003). Se realizan pruebas para comprobar con que volumen de muestra de la misma concentración (10 µg/L) se obtienen valores de respuesta superiores, manteniendo el resto de parámetros del sistema constantes. Los resultados obtenidos se exponen en la tabla III.7 y se representan en la figura III.4.

Tabla III.7. Resultados del volumen final de llenado del vial.

Condiciones	Área (cuentas)					
	MA	MC	MX	HHCB 1	HHCB 2	AHTN
Volumen 5 ml	218041	411690	124725	481680	432728	2,62E+06
Volumen 10 ml	255889	465808	152562	624925	567707	3,46E+06

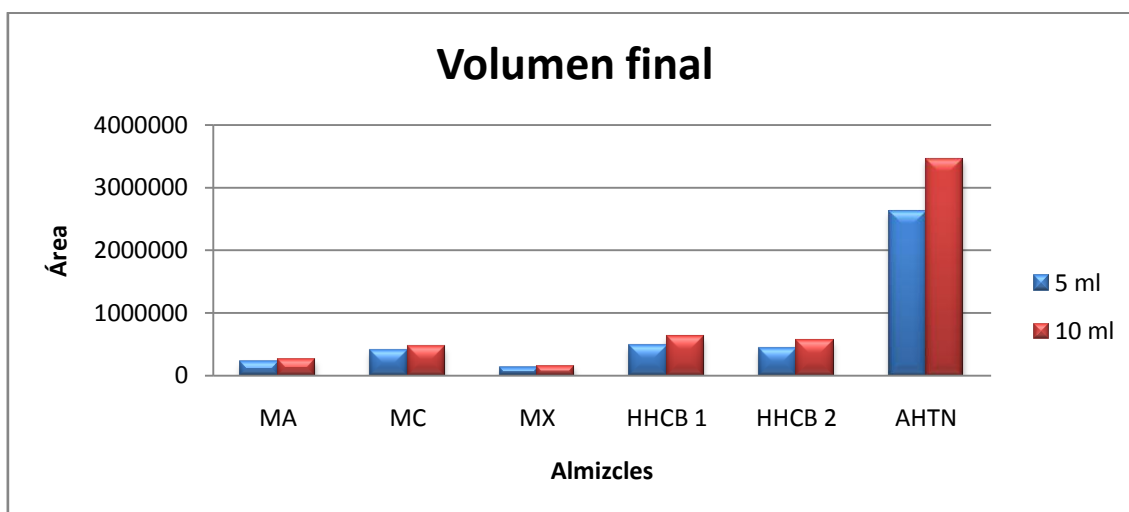


Figura III.4. Grafica que representa el área del pico frente a volumen de muestra en el vial para cada almizcle.

Los resultados nos indican que la concentración de todos los compuestos es superior para un volumen de 10 ml, volumen que a partir de

ahora se tomara tanto para la preparación de patrones como de muestras. (Ver tabla III.7 y figura III.4).

3.3. Tiempo de incubación

Se probaron diferentes tiempos en los cuales la fibra está expuesta en el vial donde se produce la extracción a una temperatura constante en todos los casos. Los tiempos de incubación seleccionados fueron 15 min, 25 min y 30 min, con la finalidad de no aumentar mucho el tiempo de extracción y con ellos el coste del análisis.

Tabla III.8. Resultados del tiempo de incubación

Condiciones Tiempo incubación	Área (cuentas)					
	MA	MC	MX	HHCB 1	HHCB 2	AHTN
15 min	199915	447465	109518	434699	389366	2,54E+06
25 min	210303	443171	118621	448493	404284	2,49E+06
30 min	285512	591812	155687	548257	490996	3,07E+06

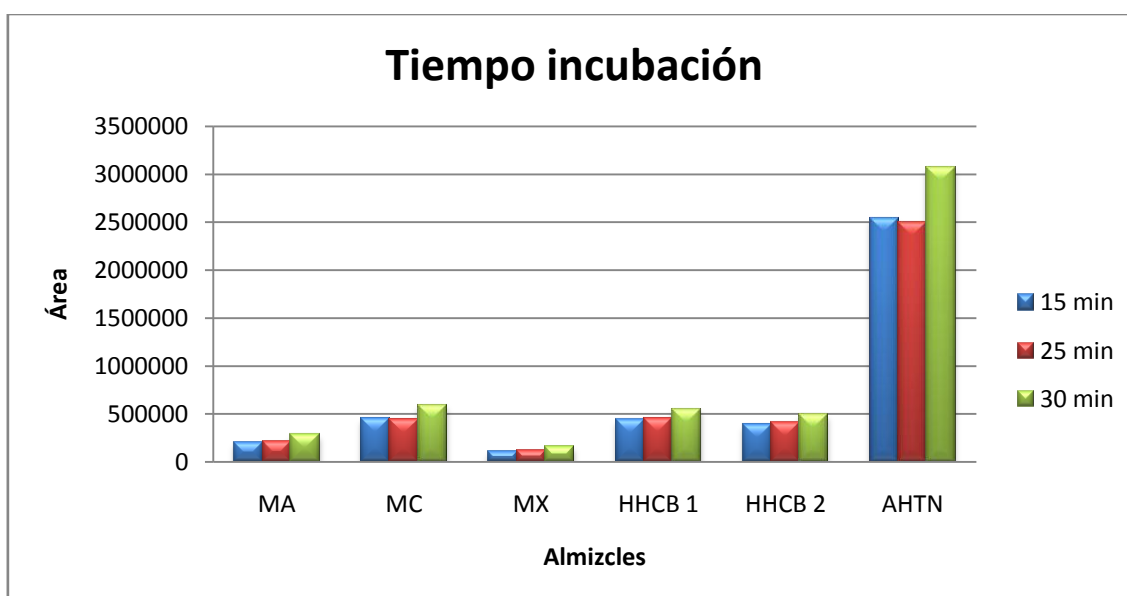


Figura III.5. Gráfica que representa el área del pico frente al tiempo de incubación de la muestra.

Se puede concluir evaluando los resultados que la extracción es mejor a 30 min a la vista de la tabla III.8 y figura III.5, al tener los valores de respuesta más altos.

3.4. Temperatura de incubación

La temperatura de incubación es otro de los parámetros a optimizar, debido a que si es muy bajo los compuestos se pueden quedar retenida en la fase acuosa, y por el contrario si es demasiado alta, los compuestos pasan a la fase gaseosa con mayor facilidad, pero se tiene que tener en consideración que la fibra desorbe los compuesto por temperatura, con lo cual, se estaría produciendo un proceso de adsorción- desorción en la etapa de incubación.

Las temperaturas que se han evaluado teniendo en cuenta que nuestra aplicación es en fase acuoso, son: 60 °C, 80 °C y 100 °C, obteniéndose los resultados de la tabla III.9 y figura.III.6.

Tabla III.9. Condiciones de extracción optimizadas para la fibra azul.

Condiciones T ^a incubación	Área (cuentas)					
	MA	MC	MX	HHCB 1	HHCB 2	AHTN
60 °C	70031	111242	49312	197949	175818	1,01E+06
80 °C	201853	351059	125236	510985	456312	2,84E+06
100 °C	351949	799371	188147	737441	663053	4,47E+06

En todos los almizcles se observa que la extracciones son mejores a la temperatura más altas de 100 °C. Obteniéndose valores próximos al doble para tonalide y almizcle cetona, mientras que para el resto de compuesto la señal aumenta un tercio.

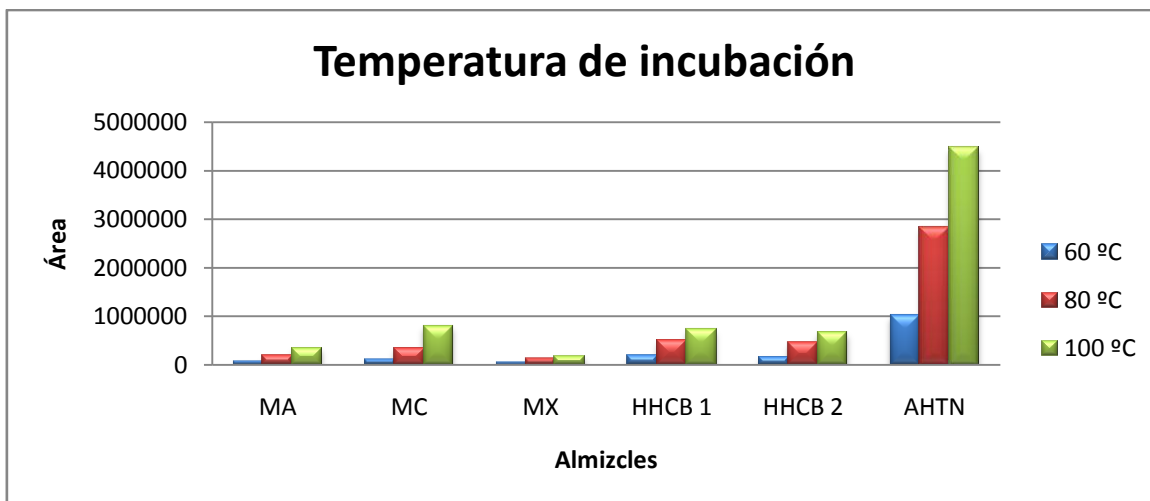


Figura III.6. Grafica que representa el área del pico frente a la temperatura de incubación de la muestra.

3.5. Tiempo de desorción de la fibra

La temperatura de desorción de la fibra se ajusta a la temperatura de acondicionamiento de la fibra de 250 °C, debido a que el fabricante la considera como la temperatura en la cual la fibra desorbe todos los compuestos retenidos, volviendo a su estado inicial de uso y activación. Los tiempos de desorción ensayados para analizar 100 ng/L de un patrón de fragancias, son: 1 min; 2 min; 5 min; y 10 min (figura III.7).

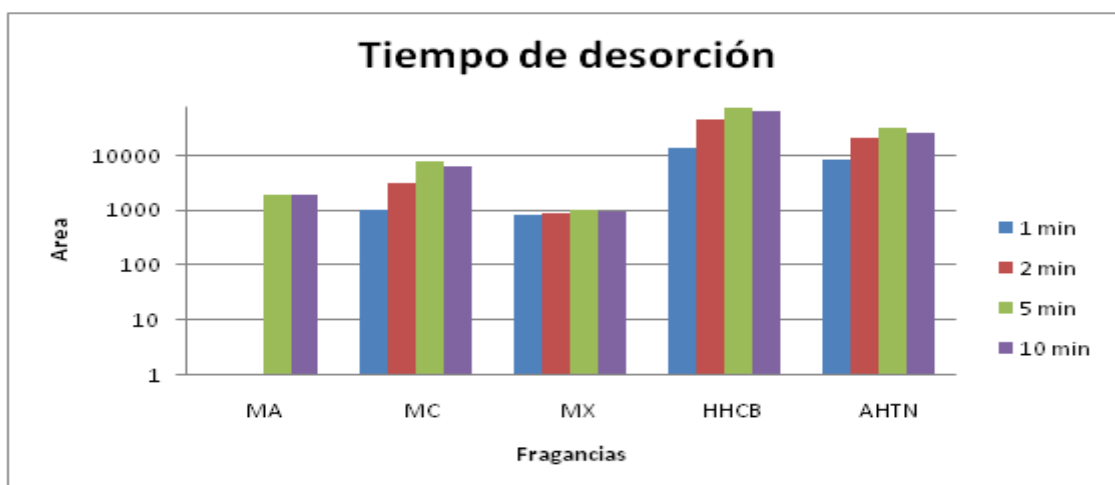


Figura III.7. Representa las área de respuesta de 100 ng/L de cada fragancia frente el tiempo de desorción de la fibra.

Se observa un aumento de señal cuando se incrementa el tiempo hasta 5 min, después permanece constante con pequeñas variaciones, pero no de manera significativa. Para no alargar mucho el tiempo del proceso cromatográfico se considera optimo 5 min. Aunque después en el método se ponen 10 min, de los cuales 5 min son en splitless y los otros 5 min de limpieza de la fibra con un split 1:100. Al elegir la desorción de la fibra en 5 min, también se provoca un cambio en la rampa de temperatura del horno, que se va a mantener a temperatura baja durante 5 min, para que los compuestos se preconcentren en cabeza de columna y así evitar que se produzcan desdoblamientos.

3.6. Efecto del pH

Se realizaron pruebas para comprobar si un cambio de pH, aumentaría el paso de los compuestos a la fase gaseosa y así aumentar la sensibilidad del método. Para ello, se partió de un patrón de 100 ng/L en agua miliQ, que presenta un pH de 7,01; se eligieron otros dos valores de pH, como fueron un pH: 10 (básico) y 4,5 (ácido). El ajuste de estos valores se realizó con NaOH y HNO₃ diluidos (se eligieron compuestos inorgánicos, para que no interfirieran en la etapa de extracción de la fibra). Los resultados se pueden observar en la figura III.8.

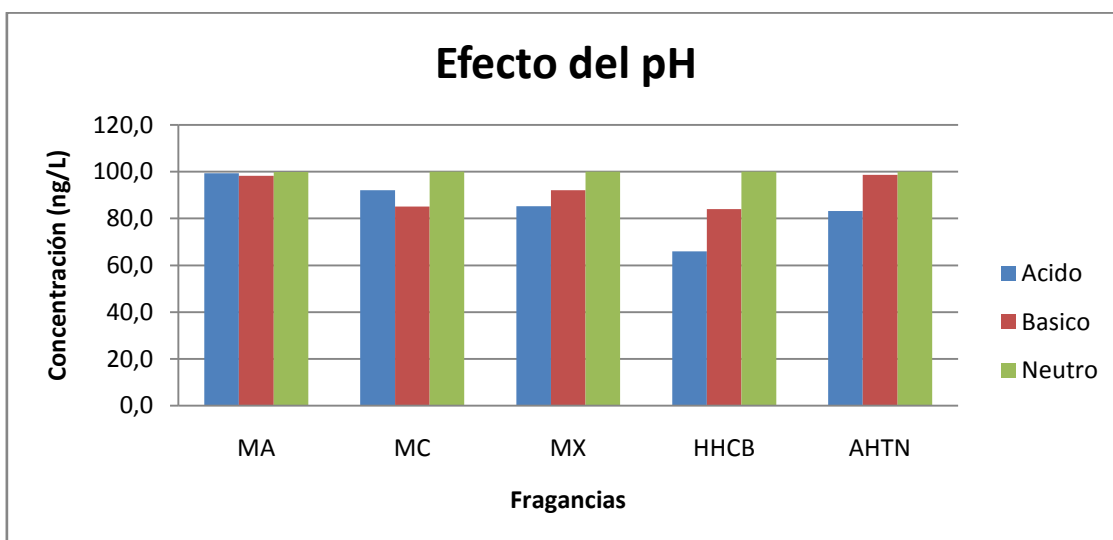


Figura III.8 Efecto del pH, en la extracción de las fragancias.

El comportamiento de los compuestos varía en función del su valor de pH, siendo el más afectado el galaxolide a pH ácido. Las fragancias nitrogenadas, tienen menos variaciones con los cambios de pH, que las policíclicas. Pero todas tienen en común que a pH neutro, sus recuperaciones son mejores en todos los casos. Se toma la decisión de no ajustar el pH de las muestras, debido a que todas las aguas muestreadas (ríos, mar y residuales urbanas), presentan un pH neutro que oscila entre 6,74 y 7,93; como se puede ver en el capítulo V de resultados.

4. Parámetros de introducción de muestra

Para la metodología propuesta se han usado dos modos de operación, inyección líquida con jeringa de 10 µl y el módulo de microextracción en fase sólida, cada uno de ellos conlleva una serie de parámetros de configuración que se detallan a continuación con los valores propuestos en cada caso.

4.1. Inyección Líquida

Los parámetros seleccionados para inyección líquida, se pueden ver en la **tabla III.10** y se explican con más detalle a continuación.

Al seleccionar el modo de inyección: GC líquida, aparecen los parámetros relacionados con esa selección. Como sería el volumen de la jeringa: (10 µl) con el que se va a trabajar. La jeringa es recomendable lavarla con disolvente, antes de la inyección para no contaminar la muestra y después de la inyección para limpiar la jeringa, de este modo también se previene posibles obstrucciones. Se indica el número de lavados que se quieren hacer y si se quieren hacer con un disolvente o con dos. En este método se hacen cuatro lavados antes y después con un único disolvente (acetona).

Tabla III.10. Parámetros en modo de inyección líquida

Injection Mode:	GC Liquid
Required Syringe:	10 ul Liquid
Read Bar Codes:	Never
Use Bar Codes:	To Generate Samplenames
Pre-Inj Washes Solvent 1:	4
Pre-Inj Washes Solvent 2:	0
Pre-Inj Sample Flushes:	1
Sample Flush Volume Pct:	50
Vial Penetration Depth Pct:	95
Plunger Fill Speed:	5.000 ul/sec
Fill Strokes:	3
Viscosity Delay:	1.000 sec
Air Volume Below Sample:	1.000 ul
Injector:	Front
Pre-Injection Delay:	0.500 sec
Plunger Inject Speed:	50.000 ul/sec
Post Injection Delay:	0.500 sec
Post-Inj Washes Solvent 1:	4
Post-Inj Washes Solvent 2:	0
GC Cycle Time (for Prep Ahead):	0 (OFF)

Otra opción es antes de pinchar, llenado y vaciado de la jeringa con la muestra. Se selecciona el volumen a tomar de la muestra (50%, significa que llene la mitad de la jeringa de muestra y lo vuelva a soltar). Esto se realiza para arrastrar el disolvente que haya quedado en jeringa, para que no provoque una dilución de la muestra.

La profundidad de penetración de la aguja en el vial (95%), es aconsejable poner que llegue lo más bajo posible, para cuando se tiene poca cantidad de muestra. La velocidad de llenado del embolo (5.000 $\mu\text{l}/\text{sg}$), depende de la densidad de la muestra, más lento cuanto más densa sea la muestra. También se indica un retraso debido a la viscosidad (1,000 sg).

El llenado de la jeringa antes de coger la muestra (3 veces) es para evitar en la medida de lo posible que se pueda coger burbujas. Para prevenir que la muestra que quede en la punta de la aguja pueda perderse se añade un volumen de aire por debajo de la muestra (1,000 μl).

Se indica la posición del inyector: (Frontal) debido a que este modelo de cromatógrafo trae tres posiciones para colocar inyectores, identificadas como frontal, central o trasera. Una vez la aguja llegue al inyector espera medio segundo antes de inyectar la muestra, la velocidad de inyección que suele ser rápida de 50,000 $\mu\text{l}/\text{sg}$, y que espere otro medio segundo antes de salir del inyector.

Hay una última opción de ciclo de tiempo del CG, para adelantar el pretratamiento: 0(OFF), esta opción se usa para cuando le muestra lleva precalentamiento y que vaya adelantándose mientras va capturando el cromatograma de la muestra anterior. Esta opción es más usada en espacio en cabeza o en SPME.

Los valores descritos en este apartado son los valores estándar que viene por defecto en el equipo para inyección líquida, al ser las muestras un extracto en disolventes comunes en cromatografía (acetona, n-hexano, tolueno, etc.) se dejan estos. Solo se ha quitado la limpieza en un segundo disolvente al no considerarse necesario.

4.2. Inyección SPME

Los parámetros seleccionados para microextracción en fase sólida se muestran en la tabla III.11, y algunos de ellos son similares a los de la inyección líquida:

El modo de inyección: "GC spme" y el tipo de jeringa SPME fibra, van correlacionados con el procedimiento que se quiere seguir en este apartado.

Para SPME, la preparación de la muestra se realiza directamente desde el automuestreador y esos parámetros son: agitación y calentamiento de las muestras, temperatura de agitación (100 °C), tiempo de preincubación (2 min), velocidad de preincubación (500 rpm), tiempo de agitación (2 min), velocidad de extracción (0 rpm= No agite mientras extrae, al estar la fibra introducida en el vial se observa roturas al agitar en este procedimiento), profundidad de la fibra desde la boca del vial (22 mm), tiempo de extracción (30 min), Tiempo de desorción (10 min).

Tabla III.11. Parámetros en modo SPME

Injection Mode:	GC SPME
Required Syringe:	SPME Fiber
Read Bar Codes:	Never
Use Bar Codes:	To Generate Samplenames
Sample Agitator:	Agitate and Heat
Agitator Temperature:	100.0 C
Pre-Incubation Time:	0:02:00
Pre-Incubation Rpm:	500 rpm
Pre-Incubation Agitator On:	2 sec
Pre-Incubation Agitator Off:	4 sec
Extraction Rpm:	0 rpm
Fiber Depth from Bottom:	22 mm
Extraction Time:	0:30:00
Injector:	Front
Desorb Time:	0:10:00
GC Cycle Time (for Prep Ahead):	0:33:00
Use Bakeout Station:	No
Bakeout Time:	0:00:00
Bakeout Temperature:	50.0 C

El tiempo de preparación para la siguiente muestra es de 33 min, desde que empieza a extraerse la que está en proceso, es decir, sirve para que mientras que esta adquiriéndose el cromatograma, se vaya realizando el proceso de extracción de la siguiente y así acortar los tiempos de análisis.

El equipo tiene un accesorio que es una unidad de calentamiento, que sirve para acondicionar las fibras, aunque esta función se puede realizar en el inyector, en la cual se puede indicar el tiempo y la temperatura de la unidad de calentamiento.

Los parámetros más importantes en este modo de inyección han sido optimizados, debido a que son las condiciones de extracción en SPME. El tiempo de extracción, temperatura de incubación y tiempo de desorción, se optimizaron en los apartados 3.3, 3.4 y 3.5, de este mismo capítulo.

Por otro lado, el resto de los parámetros fue ajustado de forma manual, debido a la experiencia. La altura de la fibra fue ajustada en el equipo para que la fibra se introdujera completamente en el vial sin tocar la fase líquida. La eliminación de la agitación en la fase de extracción vino promovida por la rotura

de las fibras en esta etapa. Por este motivo se agita de forma vigorosa antes de la extracción durante dos minutos, tiempo suficiente para disolver el ClNa.

5. Parámetros del inyector

Se detallan todos los parámetros necesarios de configuración del inyector, donde se tendría que tener en consideración:

- Rampa de temperatura o T^a constante
- Rampa de Split /Splitless
- Tipo de liner de líquidos, grandes volúmenes o SPME
- Volumen de inyección

Estos parámetros van interrelacionados entre ellos, teniendo que ser concordantes para el buen funcionamiento del método e inyector.

5.1. Inyección líquida

Las condiciones que a continuación se describen se usaron para la identificación inicial de los compuestos en el detector.

Para inyección líquida se utilizó un liner para líquidos sin fritada, en el cual el volumen de inyección quedaría limitado a un máximo de 2 µl. Donde la temperatura de inyector seleccionada es constante a 250 °C y una rampa de splitless (ver tabla III.12) en la cual, durante el primer minuto está cerrado el split para que toda la muestra entre en columna, y pasado ese tiempo, se abre el split, para limpiar el liner antes de la siguiente inyección.

Tabla III.12. Rampa de Split

Time	Split state	Split Ratio
Inicial	off	off
1:00	on	50

Estas condiciones suelen ser de uso normal en inyección líquida para trabajar en splitless.

5.2. Inyección líquida de grandes volúmenes (LVI)

En la inyección líquida en grandes volúmenes, se puede introducir un volumen máximo 10 μ l, con un liner especial para LVI con fritada.

Al introducir una muestra más rica en el sistema, la masa de analito que llega al detector también aumentará como mínimo proporcionalmente, lo que tendrá como resultado áreas de picos más grandes y picos más altos. Si se mantiene el ruido de la línea base constante, con mayores alturas de picos significan relaciones señal/ruido mayores y límites más bajos de detección de los compuestos (figura III.9).

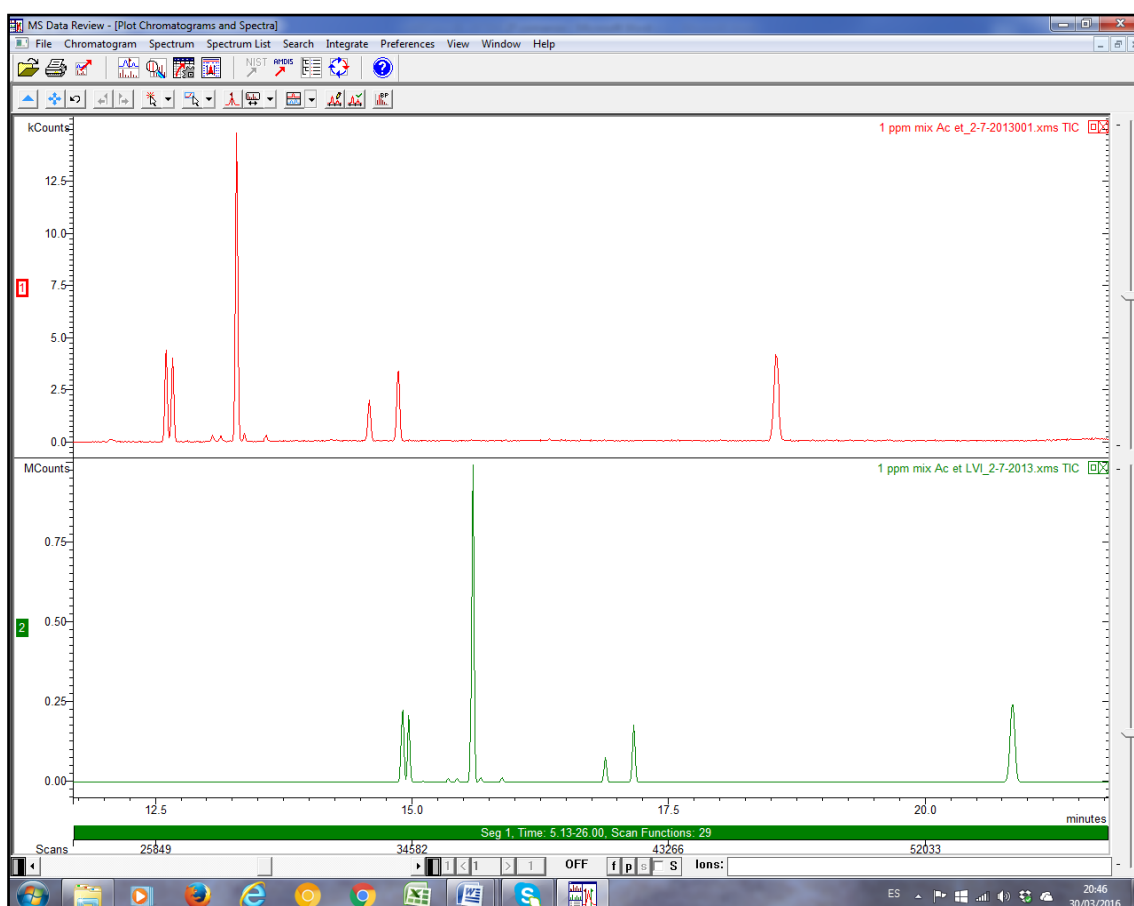


Figura III.9. Comparación de cromatogramas de 1 ppm de los almizcles inyectados con un liner normal para líquidos o con LVI.

En la figura III.9, en el cromatograma de arriba, esta inyectada la muestra como se ha descrito en el apartado 5.1, obteniendo valores de Kilocuentas, y en el de abajo como se describe en este apartado 5.2., se obtienen valores de Megacuentas, una escala 1000 veces superior. Si se superponen ambos cromatogramas, figura III.10, se observa el gran aumento de señal ganado, siendo el valor muy superior a 4 veces, siendo inapreciable el cromatograma de la muestra inyectada en la condiciones del apartado 5.1. Este aumento de señal se ha cuantificado en la tabla III.13.

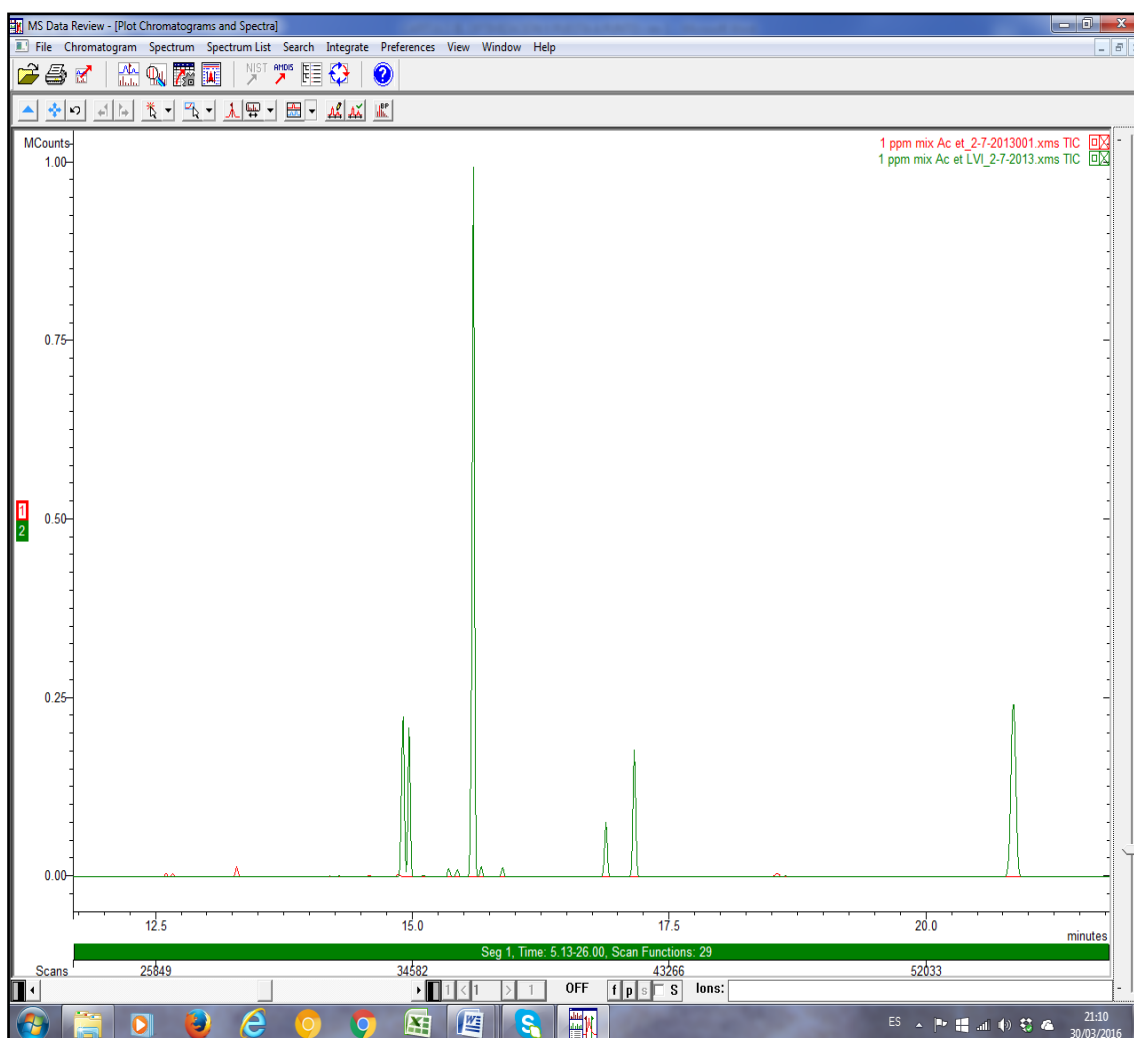


Figura III.10. Comparación de cromatogramas de 1 ppm de los almizcles inyectados con un liner normal para líquidos o con LVI, superpuestos.

Tabla III.13. Valores comparativos del incremento de señal, para los modos de inyección normal y en LVI.

Concentración	Volumen de inyección		Relación LVI/normal
	2 μ L	8 μ L	
Compuestos	Área pico liner normal (cuentas)	Área pico liner LVI (cuentas)	
Galaxolide 1	23208	1214000	52,3
Galaxolide 2	20488	1064000	51,9
Tonalide	95314	6159000	64,6
Almizcles xileno	6905	269810	39,1
Almizcles ambreta	15173	700912	46,2
Almizcles cetona	30391	1765000	58,1

El aumento de señal es entre 39,1 y 64,6 veces superior usando el liner LVI y las condiciones descritas a lo largo de este apartado. Se puede también observar que al cambiar las condiciones del inyector, también varían los tiempos de retención de los compuestos aunque no el orden de elución de los mismos (figura III.9).

El inyector está caliente para poder vaporizar instantáneamente el disolvente y los analitos, entonces la nube vaporosa resultante se pueda transferir a la columna. El volumen del liner del inyector debe ser lo suficientemente grande como para poder contener esta nube de vapor. Si el volumen del liner es demasiado pequeño, puede que la muestra vaporizada salga del liner y alcance superficies reactivas, lo que tendría como consecuencia una pérdida de analitos. Además, la ola de presión generada por la muestra vaporizada puede que presione contra el gas portador de entrada y entre en el sistema de presión y de control de flujo.

Debido a estas posibles consecuencias, se ha tomado como volumen de inyección: 8 μ l, con el propósito de evitar una posible rotura del liner, no llevándolo hasta su máxima capacidad. Se optimizaron los parámetros de split/splitless y rampa de temperatura del inyector como aparecen en las tablas III.14 y III.15.

Tabla III.14. Rampa de Split

Tiempo	Estado del Split	Relación de Split
Inicial	ON	20
0:50	OFF	off
3:50	ON	50

Tabla III.15 Programa de temperatura del inyector

Temperatura (°C)	Velocidad (°C/min)	Mantener (min)	Total (min)
70	--	0:50	0:50
280	200	8:00	8:50
70	200	0:00	10:00

El inyector se mantiene a una temperatura inicial baja durante la introducción de la muestra. Neumáticamente el inyector se encuentra en modo split con una presión de inyector baja. Se inyecta la muestra para que el líquido entrante se deposite en la pared del liner y el disolvente se evapore a un ritmo parecido. Una vez se ha inyectado la muestra completa, el inyector pasa a modo splitless para poder realizar la transferencia de los analitos. Entonces se calienta el inyector para vaporizar la muestra concentrada y el disolvente que quede para transferirlos a la columna.

Estas condiciones fueron usadas para las muestras, calibraciones y ensayos de recuperación realizados para extracción líquido-líquido y extracción en fase sólida.

5.3. Inyección SPME

Para la inyección en SPME, no hay un volumen de inyección en μl , lo que sucede en el inyector es la desorción de la fibra, para ello hay un liner especial para SPME el cual es de diámetro interno muy pequeño, la transferencia del analito al GC/MS/MS se realiza de manera altamente eficiente garantizando límites de detección bajísimos y una altísima eficiencia de

separación. Este diámetro interno es posible debido a que no se inyecta disolvente con la muestra. Nunca se puede usar un liner con fritada, debido a que al penetrar la fibra rompe al chocar con ella.

La temperatura del inyector se mantiene constante a 250 °C, y se trabaja en splitless, toda la muestra entra en columna.

La comparación de las ganancias, entre la inyección líquida LVI y el inyección en SPME, ya fue observada en la tabla III.5., siendo la señal mayor esta última. Ahora se evalúa el incremento de señal entre ellas en la tabla III.16, tomando como referencia los resultados del patrón de 100 µg/L.

Tabla III.16. Valores comparativos del incremento de señal entre LVI y SPME.

Concentración 100 µg/L	Área (cuentas)		
	SPME	LVI	Relación SPME/LVI
Almizcle ambreta	9,51E+05	44033	21,60
Almizcle cetona	1,61E+06	112250	14,34
Almizcle xileno	5,79E+05	23066	25,10
Galaxolide 1	2,60E+06	119858	21,69
Galaxolide 2	2,30E+06	108893	21,12
Tonalide	1,36E+07	296669	45,84

La ganancia de señal varía entre 14 y 46 veces superior para SPME (tabla III.16). Obteniéndose más sensibilidad en SPME, con lo cual mejores límites de detección.

6. Optimización de la determinación cromatográfica

6.1. Elección de columnas y parámetros

Para los compuestos objeto de estudio, en la mayoría de los artículos de la bibliografía consultada (tabla I.8) usan una columna de VF-5MS (30m x 0.25mm x 0.25µm), una columna muy versátil, compuesta de (95%) Dimetil-(5%) difenilpolisiloxano, fase entrecruzada y químicamente ligada (figura III.11). La columna VF-5MS utiliza la misma fase estacionaria que la BR-5 pero tanto

el proceso de síntesis del polímero, como la técnica de desactivación del capilar y el procedimiento de ligado y entrecruzado han sido optimizados para conseguir que el sangrado de esta columna sea el mínimo posible y al mismo tiempo su inercia química sea excepcional. Es una columna no polar, que tiene un rango de temperaturas de trabajo comprendidas entre: -60°C hasta $325/350^{\circ}\text{C}$. Está indicada para compuestos semivolátiles, alcaloides, ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME), drogas, compuestos halogenados, pesticidas, herbicidas, etc.

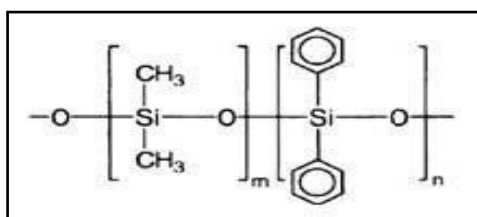


Figura III.11. Estructura Poli(difenildimetil)siloxano

También se ha evaluado el uso de una columna con un relleno diferente como es la BR-sWAX (30m, 0.25 mm, 0.25 μm), compuesta 100% de polietilenglicol (PEG), fase entrecruzada y ligada (figura III.12). Columna de polaridad alta. Amplio rango de temperaturas de trabajo comprendido entre: 40°C a $260/270^{\circ}\text{C}$ columna polar adecuada para los análisis de alcoholes, aldehídos, cetonas, isómeros aromáticos, ácidos orgánicos libres, disolventes, FAME, aceites esenciales, aromas y fragancias.

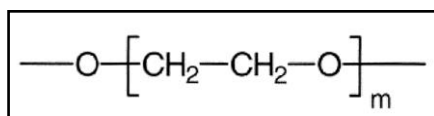


Figura III.12. Estructura Polietilenglicol

Se identificaron los compuestos en ambas columnas, aunque como era de esperar en diferente orden de elución, como se puede observar en la tabla III.17, los valores correspondientes a los tiempos de retención y orden de elución de cada compuesto. Mientras que en las figuras III.13 y III.14, se

aprecia los correspondientes picos cromatográficos, y su diferente orden de elución de los almizcles dependiendo de la columna.

Tabla III.17. Tiempos de retención en ambas columnas

VF-5MS		Compuestos	BR-sWAX	
Orden de elución	Tr (min)		Tr (min)	Orden de elución
2	16,672	Galaxolide 1	14,581	1
		Galaxolide 2	14,648	2
4	16,885	Tonalide	15,294	3
3	16,798	Almizcle Xileno	16,585	4
1	16,085	Almizcle Ambreta	16,863	5
5	19,153	Almizcle Cetona	20,243	6

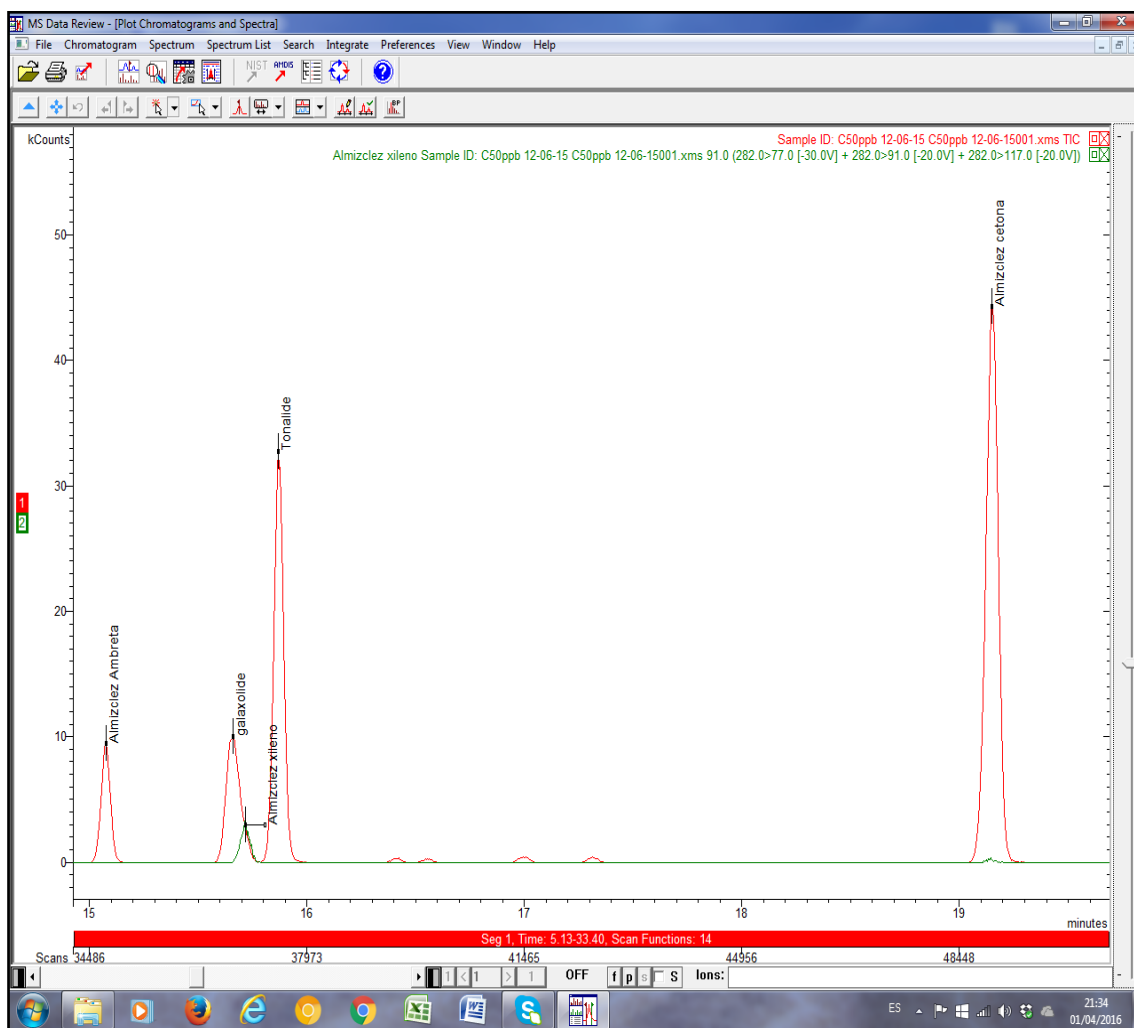


Figura III.13. Cromatograma de un patrón en una columna VF-5MS.

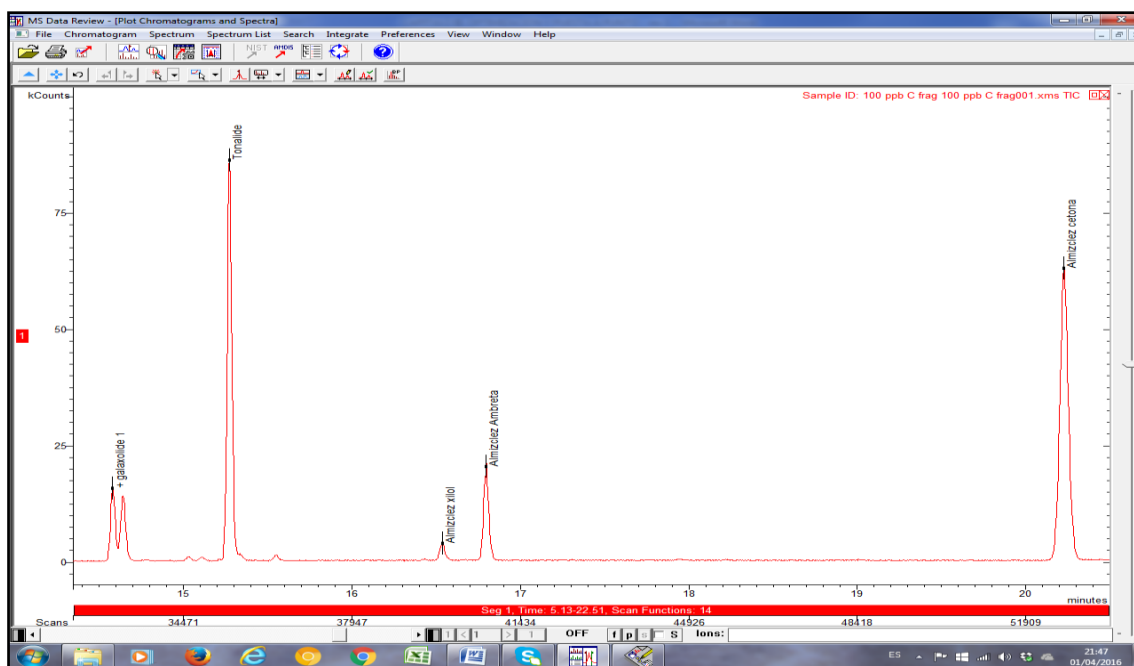


Figura III.14. Cromatograma de un patrón en una columna BR-sWAX.

Es de destacar dos cosas: la primera que en la columna VF-5MS, solapan los picos del galaxolide y del almizcle xileno, aunque eso no es un problema con un detector de espectrometría de masa, al tener transiciones de masas características de cada compuesto (se pueden cuantificar sin ningún problema). En segundo lugar, el pico de galaxolide, aparece en la columna BR-sWax como dos picos. En diferentes páginas web: (Chimica in JSmol; Phenomenex) hacen referencia a Galaxolide 1, 2 y/o 1+2, también los diferencia la librería espectral NIST. Para volver a verificar que los dos picos que aparecen proceden de galaxolide, se inyecta individualmente y salen dos picos similares al mismo tiempo de retención en la columna BR-sWax. Esto no se apreciaba en la columna VF-5MS, donde coeluyen (1 pico). Buscando información se verifica este hecho, donde en la columna BR-sWax, se separan los dos enantiómeros del galaxolide.

El galaxolide presenta una pureza del $\geq 95\%$, que es la suma de sus isómeros, tiene centros quirales en el carbono 4 y 7. Los isómeros son (4R, 7R), (4R, 7S), (4S, 7S) y (4S, 7R). La investigación (Frater et al., 1999), ha demostrado que en particular la (4S, 7R) y (4S, 7S) son las formas de

galaxolide que presentan las más poderosas notas de almizcle, con umbrales de olor de 1 ng /L o incluso inferiores.

El isómero principal se compone de dos diastereoisómeros, que no están separados en las columnas capilares de uso común como la poli(difenildimetil)siloxano (fase no polar). Sólo en columnas más específicas, tal como las polietilenglicol de fase estacionaria polar, los diastereoisómeros son separados en el CG en una proporción de 1: 1. Cada diastereoisómero consiste en un par de isómeros enantioméricos. Sólo en columnas muy especiales utilizando ciclodextrinas modificadas como fase estacionaria quiral son capaces de separar los isómeros enantioméricos. El galaxolide tiene dos átomos de carbono asimétricos presentes y por lo tanto de cuatro enantiómeros como se muestra en la figura III.15.

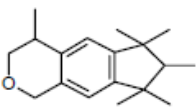
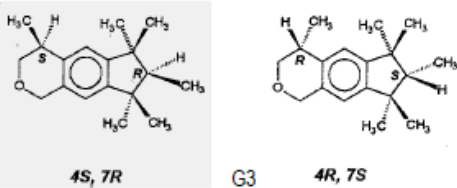
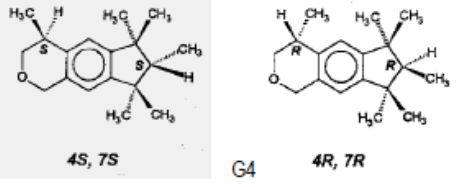
main isomer 75%		15-20% other isomers, section 1.2.1
Two diastereoisomers:	each with two enantiomers:	
<i>cis</i> - isomers	4 <i>S</i> ,7 <i>R</i> and 4 <i>R</i> ,7 <i>S</i>	 G2 4 <i>S</i> , 7 <i>R</i> G3 4 <i>R</i> , 7 <i>S</i>
<i>trans</i> - isomers	4 <i>S</i> ,7 <i>S</i> and 4 <i>R</i> ,7 <i>R</i>	 G1 4 <i>S</i> , 7 <i>S</i> G4 4 <i>R</i> , 7 <i>R</i>
		musky odour ↑ (mainly 4 <i>S</i> ,7 <i>R</i>)

Figura III.15. Estructura de los enantiomeros del galaxolide

Debido a los diferentes rangos de temperaturas de trabajo de las columnas, las rampas de temperatura del horno también diferían como se puede apreciar en las siguientes tablas III.18 y III.19, soportando menos temperatura la columna BR-sWAX.

Tabla III.18. Rampa de temperatura del horno para la columna VF-5MS

Temperatura (°C)	Rampa (°C/ min)	Mantener (min)	Total (min)
60	0	1:00	1:00
120	20	0:00	4:00
180	10	0:00	10:00
195	1	0:00	25:00
280	25	5:00	33:40

Tabla III.19. Rampa de temperatura del horno para la columna BR-sWax

Temperatura (°C)	Rampa (°C/ min)	Mantener (min)	Total (min)
60	-	5:00	5:00
140	25	0:00	7:20
235	10	4:00	21.70
250	25	2:00	24.30

Esta rampa fue modificada a lo largo de la optimización del método, quedando con estos valores como definitivos. Se comparan ambas columna, inyectando un patrón (1 ppm) de todos los compuestos estudiados obteniendo los siguientes resultados (tabla III.20 y figura III.16).

Tabla III.20 Comparación entre columnas

Área (patrón de 1 ppm) (cuentas)		
Compuestos	BR-sWax	VF-5MS
Galaxolide 1	112725	0
Galaxolide 2	225412	814520
Tonalide	33220	534250
Almizcle xileno	43886	28080
Almizcle Ambreta	84778	88520
Almizcle cetona	169763	93910

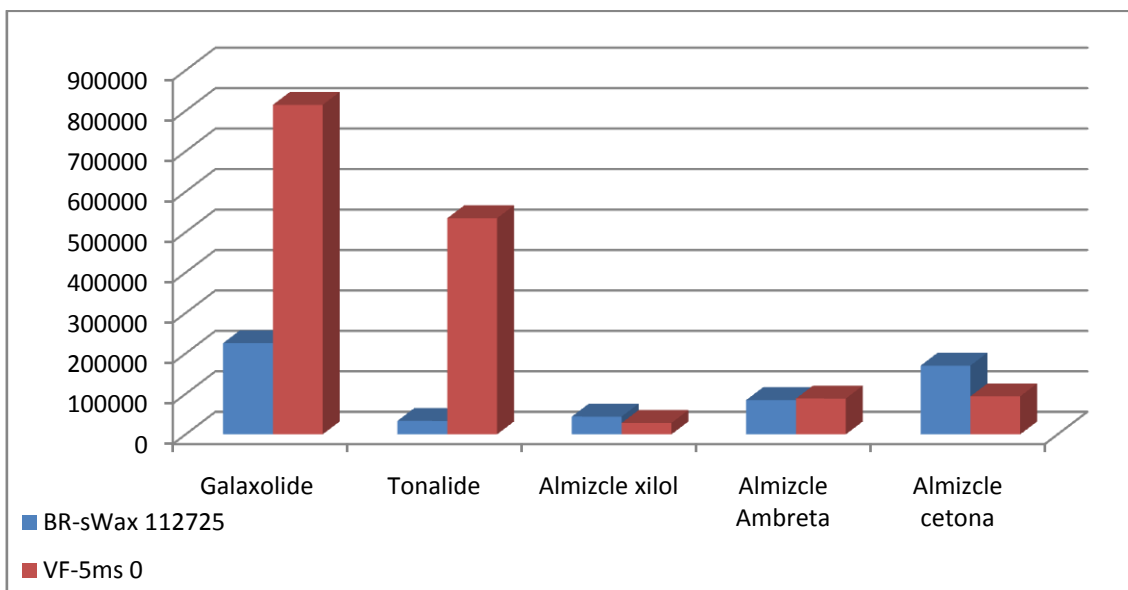


Figura III.16. Área de un patrón de almizcles de 1 ppm en diferentes columnas cromatográficas.

Siendo los compuestos galaxolide y tonalide más intensos en la columna VF-5MS, el almizcle ambreta mantiene una respuesta similar en ambos casos y los otros dos almizcle prácticamente el doble en la columna BR-sWax. Se decide usar la columna BR-sWAX pues da una mayor respuesta para los nitro almizcles que tienen menor límite de detección que las fragancias galaxolide y tonalide. Además de que al desdoblarse el galaxolide por la separación de sus enantiomeros se obtiene información adicional. Con lo cual se concluye seguir este proyecto de investigación con la columna BR-sWAX, que va a aportar información más novedosa.

6.2. Desarrollo de la espectrometría de masas

6.2.1. Introducción

En los detectores de espectrometría de masas triplecuádrupolo, se puede trabajar en diferentes modo de adquisición como son a través de un barrido de masas que es lo que se conoce como "Full Scan"; Detectando masas características de cada compuestos "modo SIM", y comprobando que

salen al mismo tiempo de retención que en el barrido de masas . Estos modos de trabajar se pueden conseguir con un equipo de un solo cuadrupolo, debido a que ambas formas de adquisición se realizan solo con el primer cuadrupolo, teniendo el segundo y tercer cuadrupolo inactivos. Solo se puede conseguir trabajar en Masas/Masas, si se tiene un equipo con detector de triplecuadrupolo. Para trabajar en Masas/Masas, una vez que se tienen seleccionados los iones característicos de nuestro compuesto, a los cuales se les llaman precursores o padres (los seleccionados para trabajar en SIM), se seleccionan en Q1, y se hace un barrido de masas en Q3, donde se obtiene los iones productos o hijos. A este modo de trabajo se le llama "Product Scan". En el segundo cuadrupolo es donde se produce la rotura de los iones precursores mediante impacto con una fuente de iones argón para dar los correspondiente iones productos. Seleccionando los iones precursores de mayor masa/carga y más intensos, de equivalente forma se seleccionan los iones productos, así se obtiene el método de Masas/Masas. Se va a desarrollar cada uno de estos modos de operación para llegar al método final seleccionado.

6.2.2. Full Scan

La optimización del método cromatográfico se realiza en inyección líquida en todos los casos. Empezando por inyectar individualmente un patrón de concentración conocida de cada una de las fragancias a estudiar, para conocer su tiempo de retención y su respuesta en el equipo. Para ello, se realiza un barrido de masas (Full Scan) entre 40 – 300 uma, la masa más alta debe ser un poco superior al peso molecular de los compuestos o similar. Se trabajo a flujo constante de 1 ml/min, donde el gas portador es Helio. La Temperatura de la línea de transferencia (250 °C) coincide con la temperatura final de la rampa del horno, para que los compuestos no condensen en la línea de transferencia al espectrómetro de masas. La Temperatura de la Fuente de ionización (270 °C), debe ser superior entre 20-30°C a la de la línea de transferencia para que los compuestos no se queden pegados a la fuente y se produzcan problemas de contaminación.

En las figuras III.17 a la III.22 que a continuación aparecen, se observa los picos cromatográficos de los compuestos en full scan y su espectro de masas experimental.

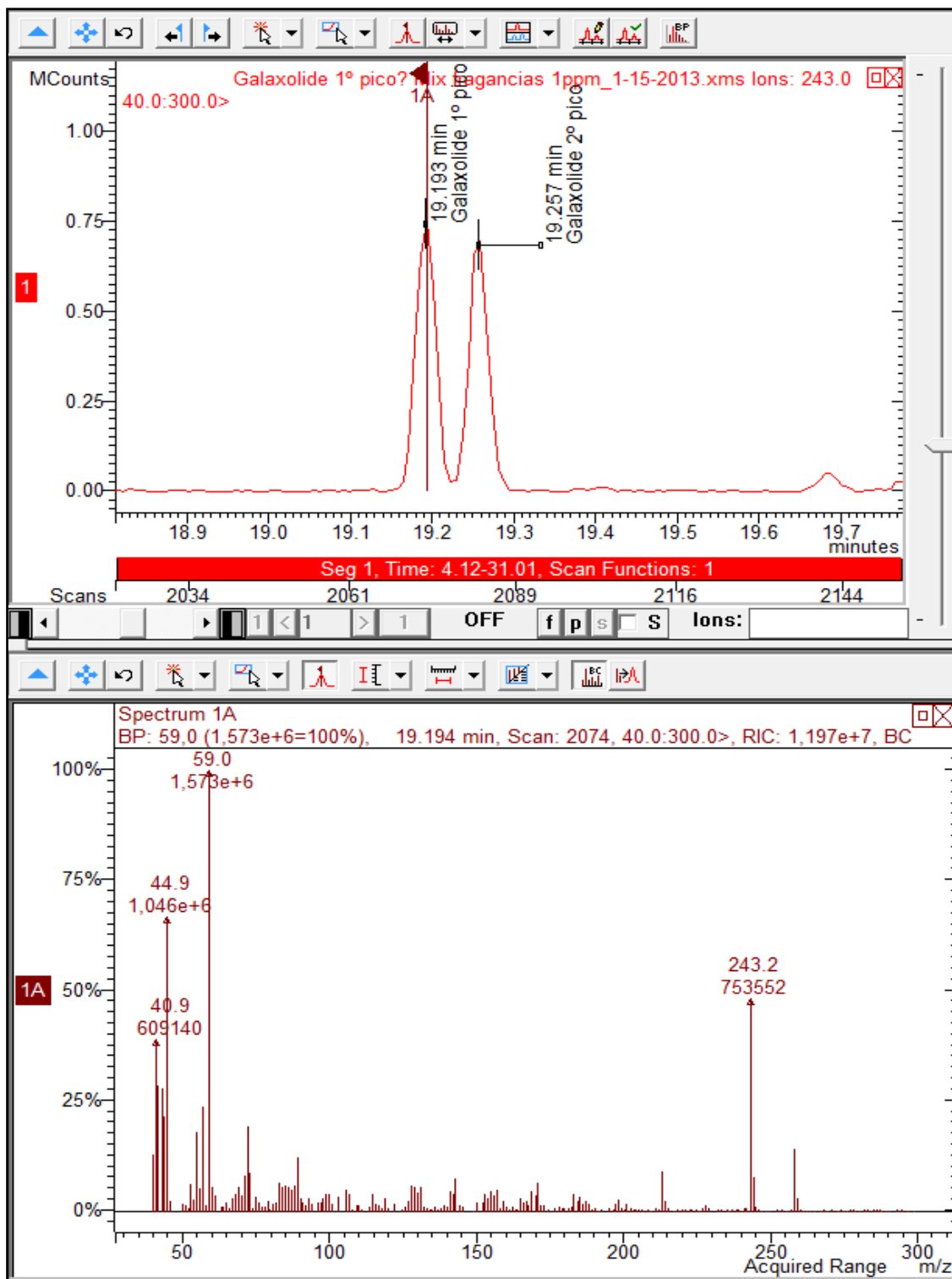


Figura III.17. Cromatograma y espectro de masas de galaxolide 1 Full Scan.

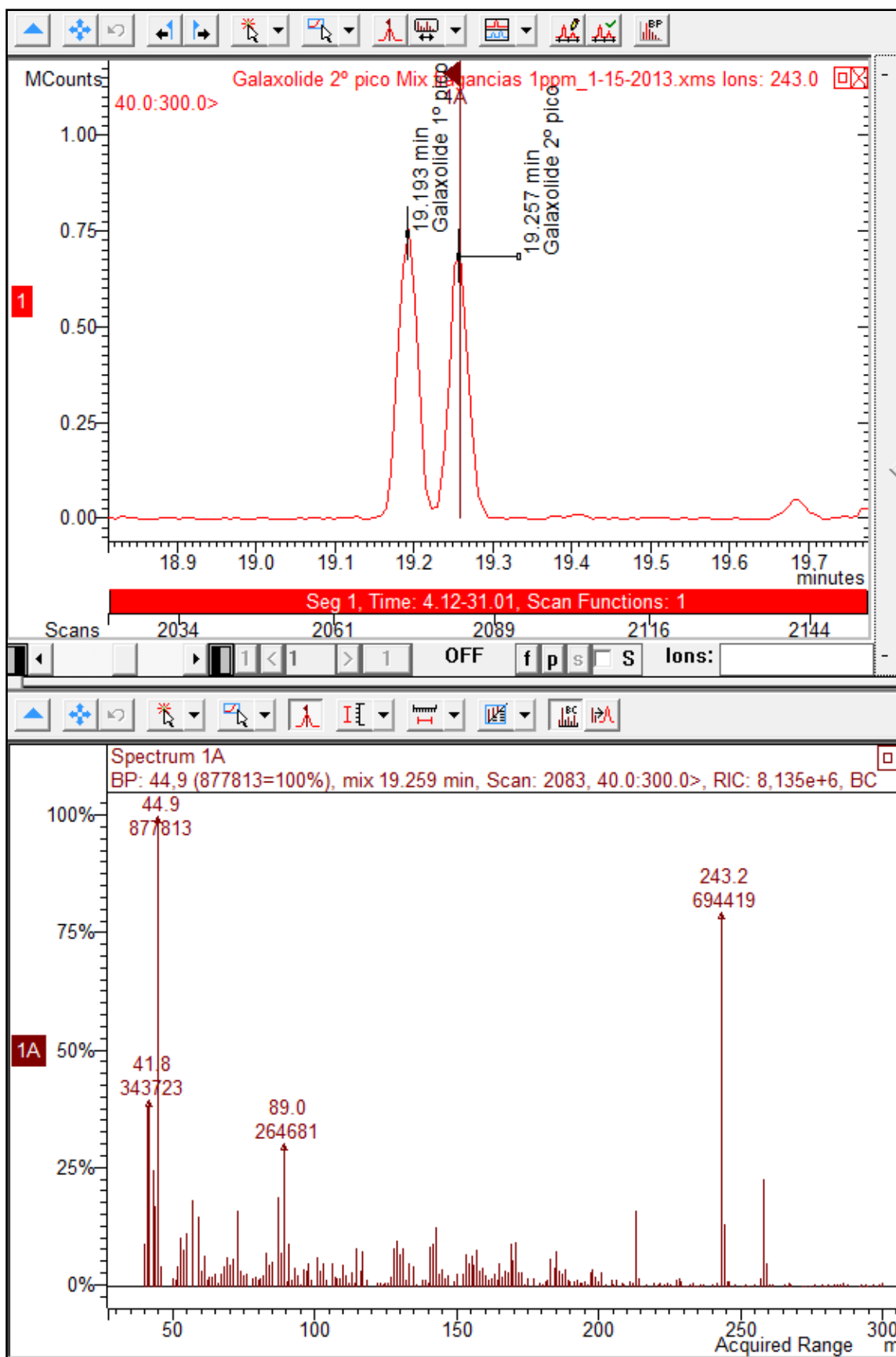


Figura III.18. Cromatograma y espectro de masas de galaxolide 2 Full Scan.

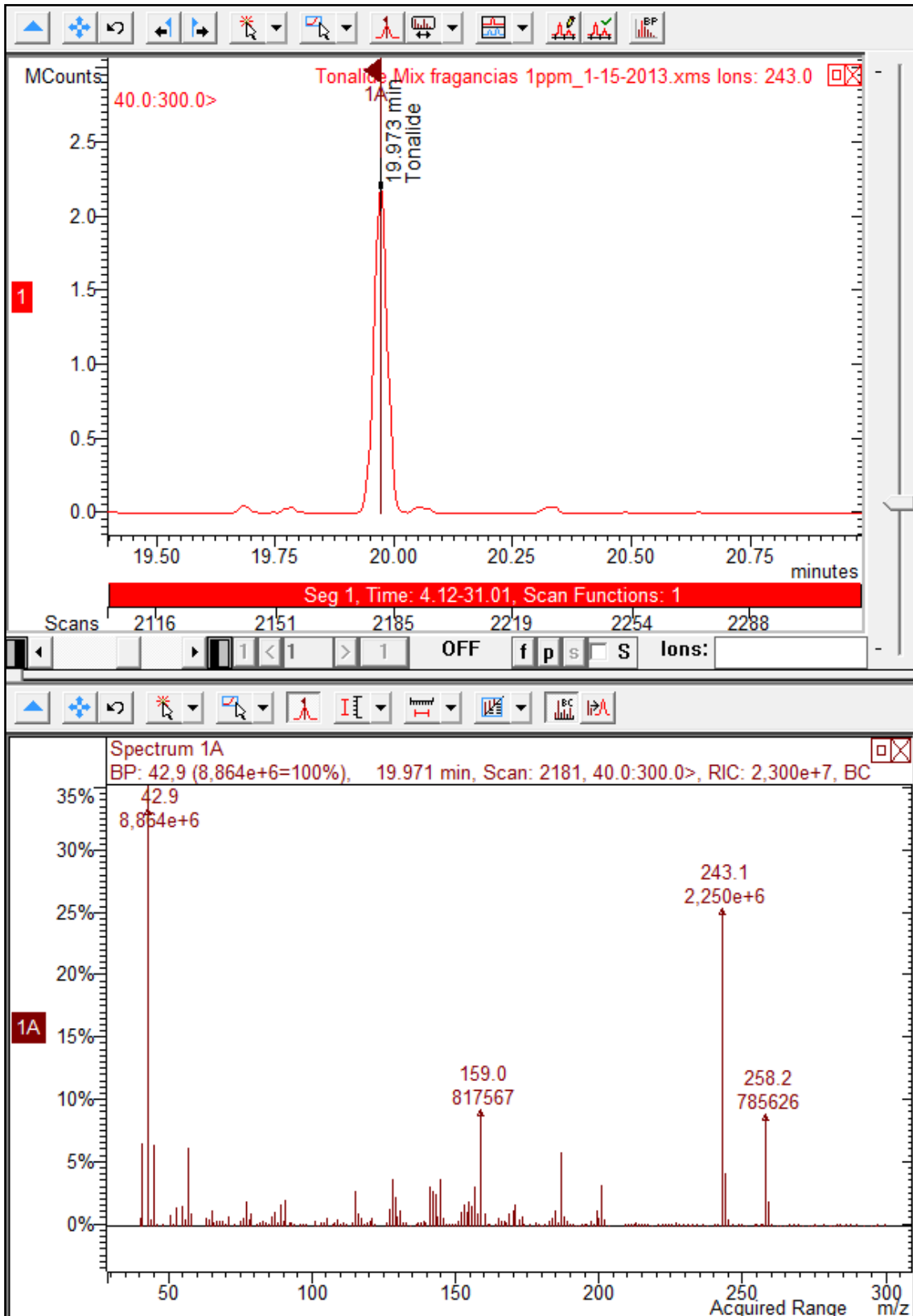


Figura III.19. Cromatograma y espectro de masas de tonalide Full Scan.

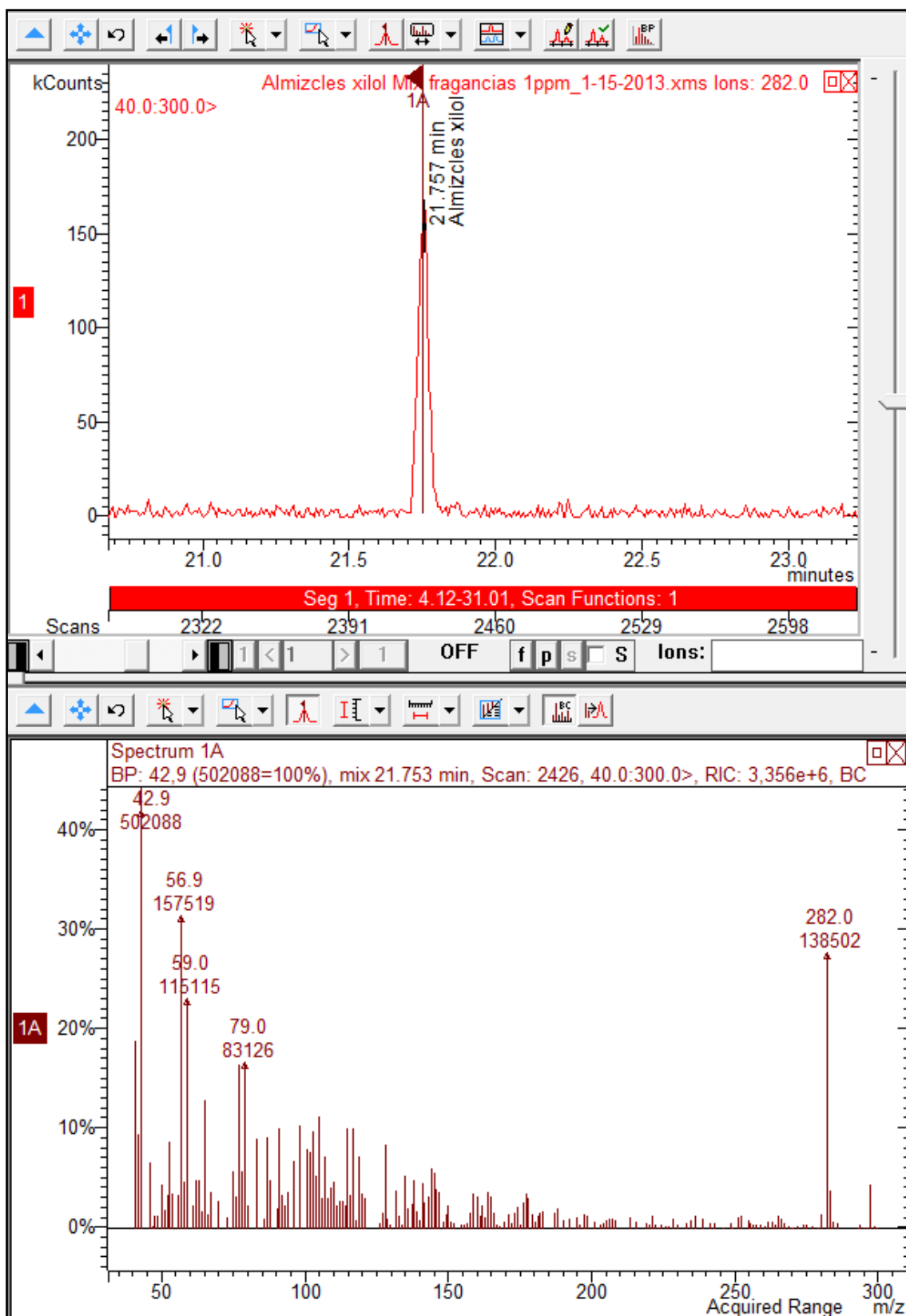


Figura III.20 Cromatograma y espectro de masas de almizcles xileno Full Scan.

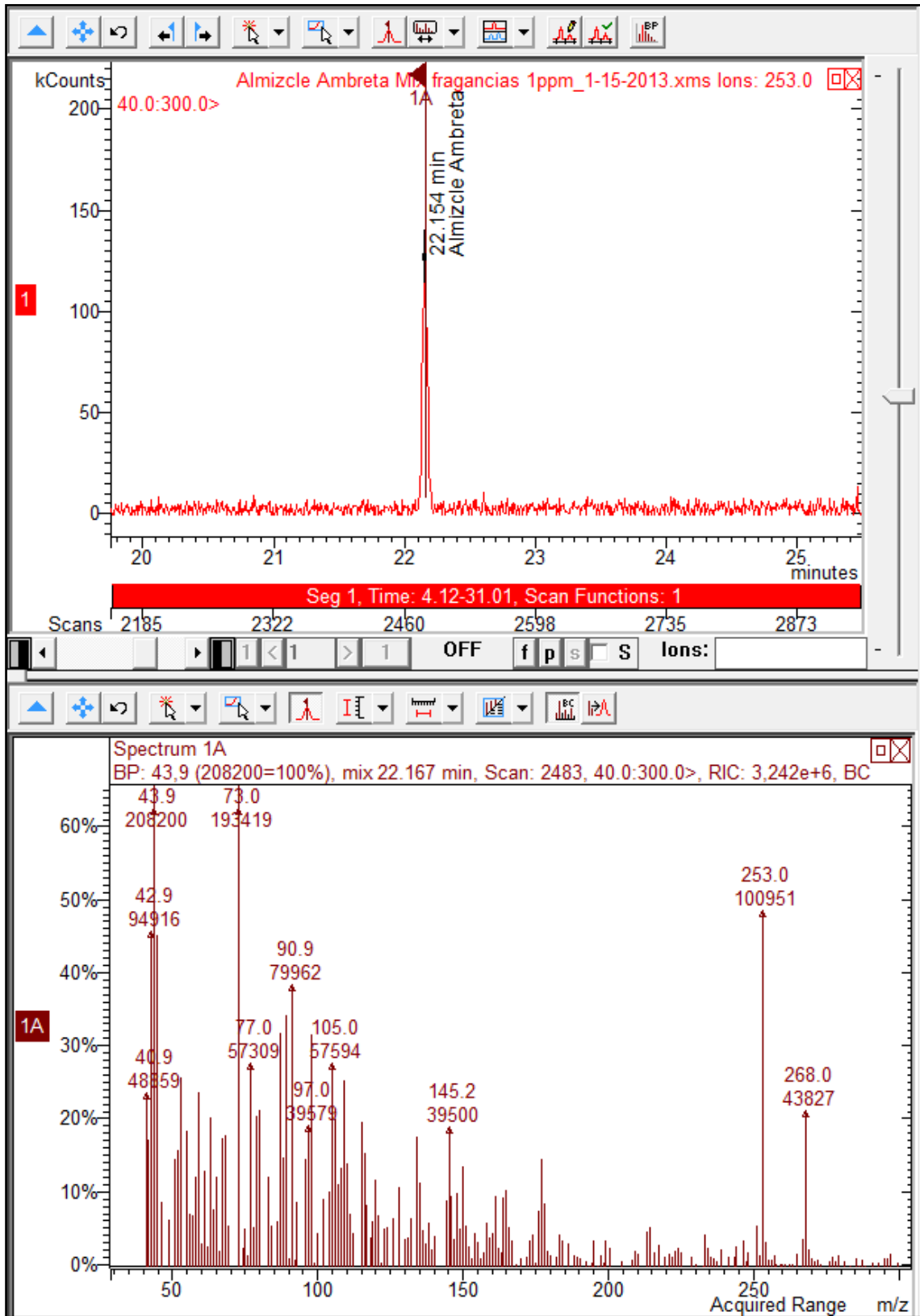


Figura III.21. Cromatograma y espectro de masas de almizcles ambreta Full Scan.

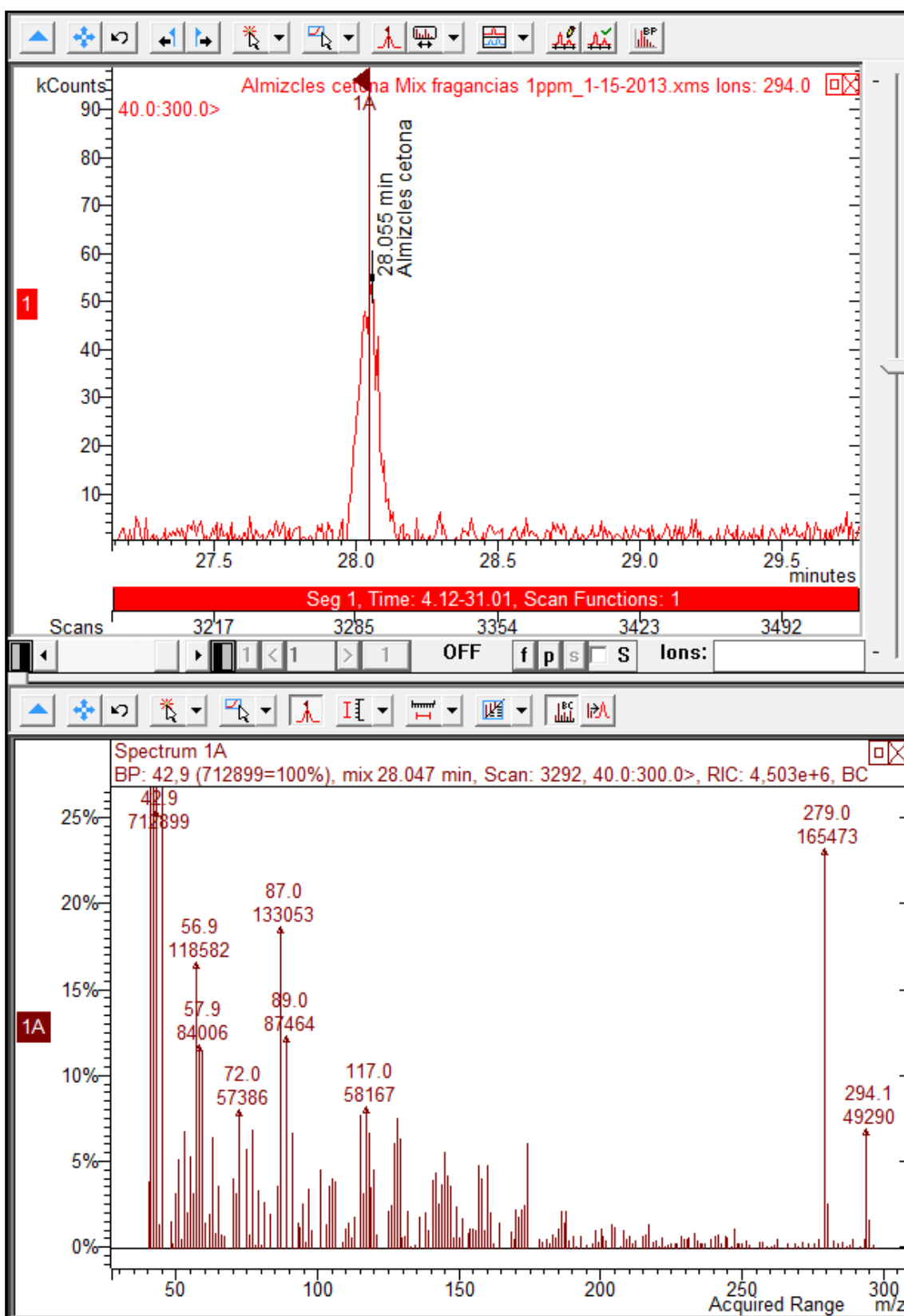


Figura III.22. Cromatograma y espectro de masas de almizcles cetona Full Scan.

Para verificar la identificación de los compuestos se busco cada uno de ellos en la NIST, para saber cuáles son sus iones característicos (más intensos y con mayor masa /carga) y se buscaron en el cromatograma, coincidiendo todos ellos al mismo tiempo de retención. Ese pico se envía a la biblioteca de espectros y se confirma la identificación del compuesto. Así se procedió para los cinco compuestos objeto de estudio. Como se puede observar en la imagen siguiente.

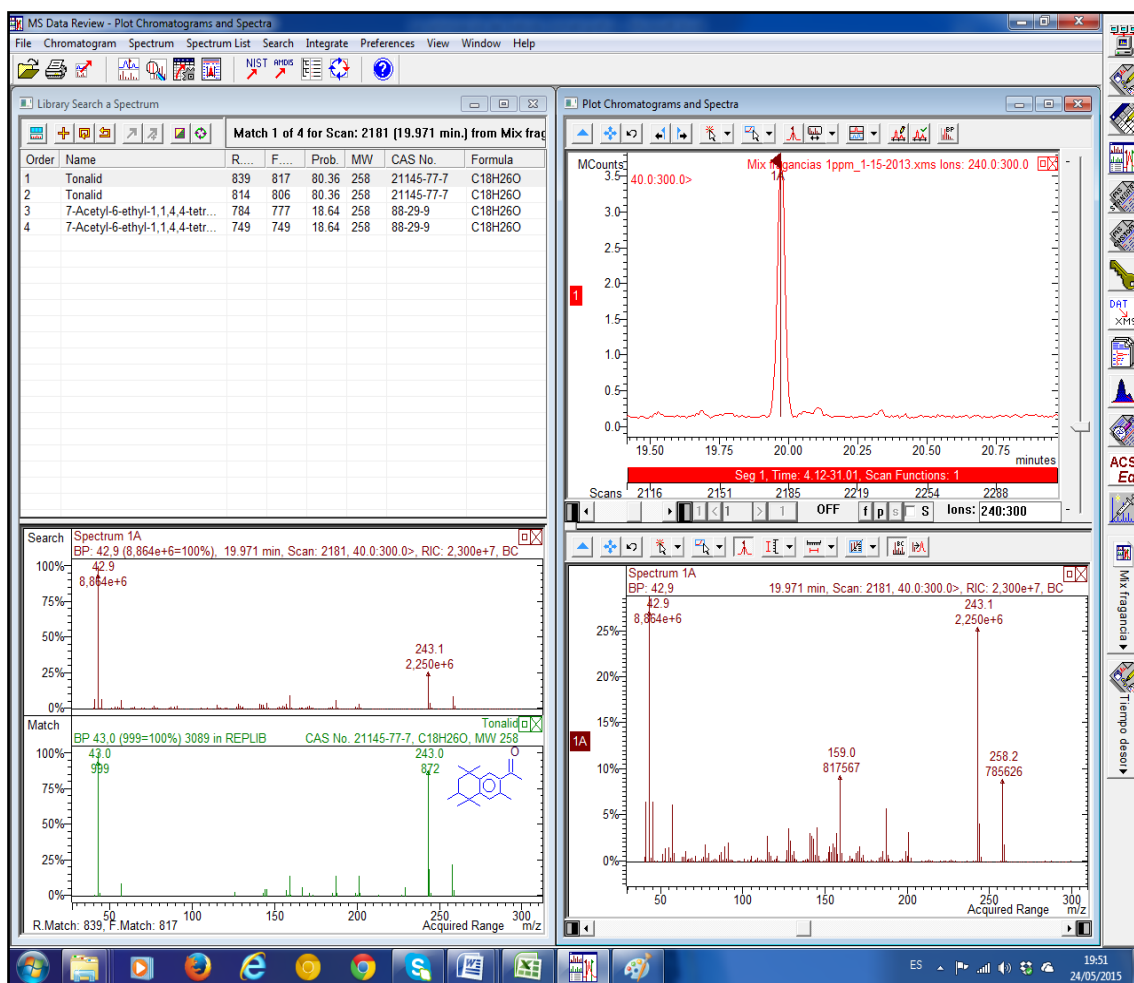


Figura III.23. Búsqueda del tonalide adquirido en Full Scan en la librería espectral NIST

En conclusión la búsqueda de los compuestos y sus espectros fueron comprobados con la biblioteca NIST, identificándolos en todos los casos con el almizcle deseado, como se observa en el ejemplo de la figura III.23. Los iones

característicos de cada compuesto (figuras III.18 a la III.22) coinciden con lo que se habían buscado en la bibliografía (capítulo II), como se puede comprobar.

La búsqueda de los compuestos solo se puede hacer en la librería espectral NIST, cuando el cromatograma es adquirido en Full Scan, donde el espectro de los compuestos es completo. Cuando se buscan masas concretas, esas masas pueden estar en ciento de compuestos y la comparación espectral puede coincidir con miles de compuestos, no siendo fiable ni concluyente en ningún caso.

A continuación se ha realizado la inyección de la mezcla de los almizcles en una concentración de 1 ppm, obteniendo el cromatograma de la figura III.24, con una correcta separación de sus picos.

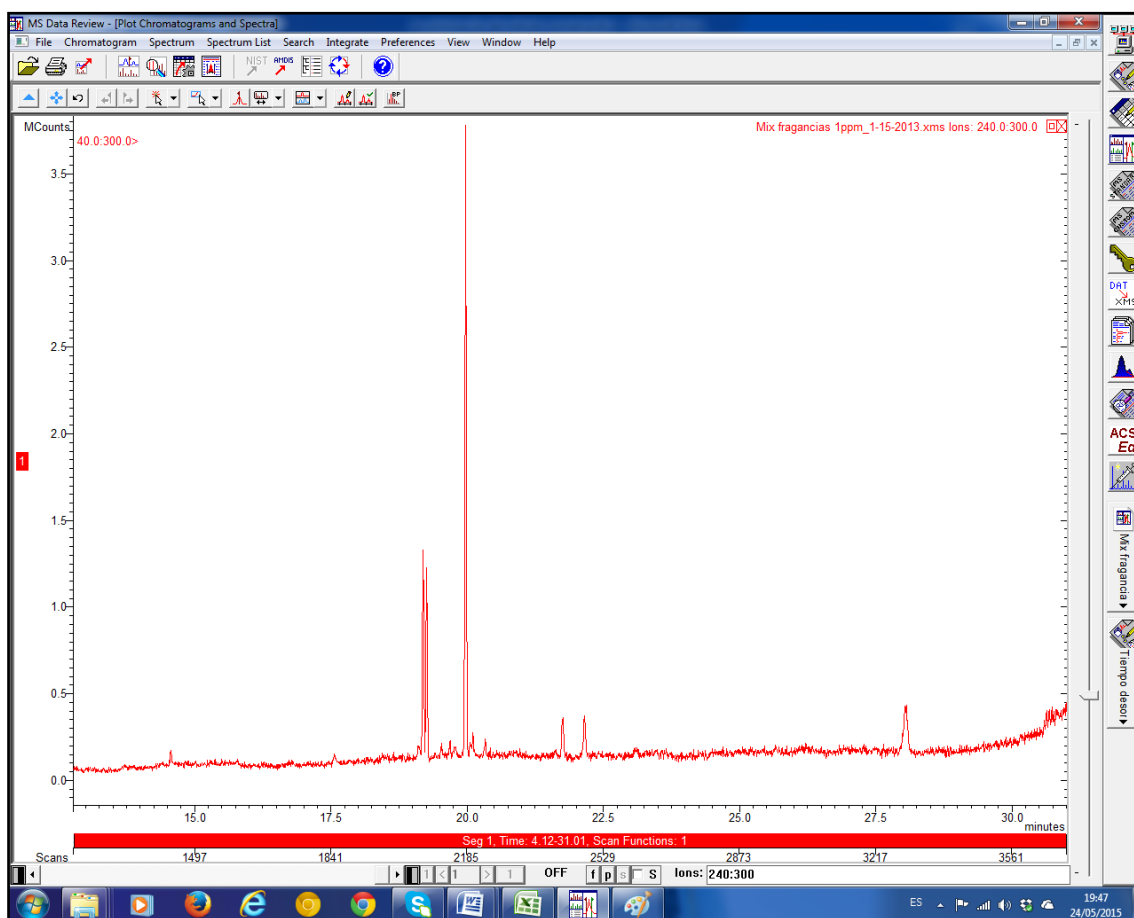


Figura III.24. Cromatograma de un patrón de fragancias en acetona en Full Scan de todos los compuestos.

En conclusión, con los resultados obtenidos en esta primera parte ya se ha conseguido separar e identificar los compuestos, incluso si la concentración de los compuestos fuese alta es decir de mg/L podría trabajarse con este modo de adquisición. Se han obtenido los tiempos de retención de los compuestos y sus iones característicos. Datos que se resumen en la siguiente tabla III.21.

Tabla III.21. Resumen de resultados obtenidos en Full Scan.

Tiempo retención	Compuesto	Nº Cas	Peso molecular	Iones característicos
19,193	Galaxolide 1	1222-05-5	258	243; 213; 258; 244; 185
19,259	Galaxolide 2	1222-05-5	258	243; 213; 258; 244; 183
19,971	Tonalide	21145-77-7	258	243; 258; 159; 43
21,751	Almizcle xileno	81-15-2	297	282; 297; 265; 128
22,159	Almizcle Ambreta	83-66-9	268	253; 268; 223; 269
28,047	Almizcle cetona	81-14-1	294	294; 279; 128; 115

6.2.3. SIM

El modo SIM, consiste en una monitorización selectiva de iones característicos de los compuestos presentes en la muestra. La comparación de las respuestas relativas de los distintos iones (cualificadores), con respecto a las del patrón permite confirmar la identificación del compuesto cuantificado. La sensibilidad se incrementa con la reducción del nº de masas seleccionado y la selectividad con el aumento de la masa monitorizada. En modo SIM, el cromatograma completo (TIC) es el correspondiente a la suma de abundancias de todas las masas adquiridas.

Una vez identificado los picos, se confirman a través de un método en SIM, donde se buscan los dos o tres iones más intenso para cada compuesto, de esta manera se consigue confirmar el tiempo de retención de los picos y eliminar ruido, ya que en el primer cuadrupolo (Q1) solo se filtraran esas masas

concretas. En este caso las masas seleccionadas se pueden visualizar en la tabla III.22.

Tabla III.22. Valores de adquisición del espectro de masas en el método SIM.

	CAS Number	Compound Name	Polarity	Q1 First Mass	Q1 Last Mass	Q3 First Mass	Q3 Last Mass	Capillary	Collision Energy	Req. Dwell Time
1		Tonalide	Pos.	159,00						0,030
2		galaxolide	Pos.	213,00						0,030
3		Tonali- galaxolide	Pos.	243,00						0,030
4		MA	Pos.	253,00						0,030
5		Tonali- galaxolide	Pos.	258,00						0,030
6		MA	Pos.	288,00						0,030
7		MK	Pos.	279,00						0,030
8		MX	Pos.	282,00						0,030
9		MK	Pos.	294,00						0,030
10		MX	Pos.	297,00						0,030
11			Pos.							
12			Pos.							
13			Pos.							
14			Pos.							
15			Pos.							
16			Pos.							
17			Pos.							
18			Pos.							

En el caso del Tonalide y el Galaxolide, se toman tres iones debido a que las masas 243 y 258, son comunes para ambos compuestos, con el objetivo de volver a confirmar el tiempo de retención de las fragancias. En la figura III.25, se puede ver el cromatograma de los compuestos adquiridos en SIM.

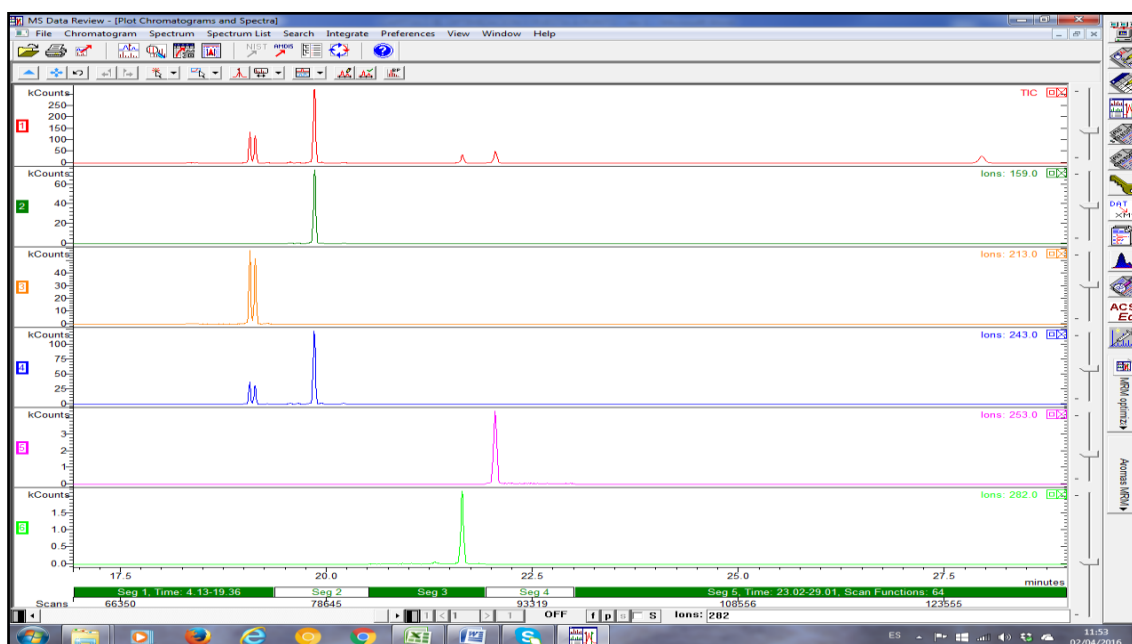


Figura III.25. Cromatograma de los compuestos adquiridos en modo SIM.

En la figura III.25, se puede observar en algunos ejemplos que eligiendo el ión característico de cada compuesto, solo sale el pico o picos cromatográfico del compuesto que presenta esas masas a lo largo de todo el cromatograma. Si se comprueba con el primer cromatograma de la imagen, los tiempos de retención se mantienen al adquirir en modo SIM, con lo cual el desarrollo del método y los iones precursores seleccionados serian correctos.

6.2.4. Product Scan

Una vez seleccionados los iones precursores o padres, se hace un barrido de masas de los iones hijos, para obtener estos iones productos y entra en consideración otro parámetro a evaluar, como es la energía de colisión (energía que se le proyecta a los iones precursores para que rompan y den los iones productos). Hay que evaluar cual es la energía optima para obtener las mejores roturas. La energía de colisión varía entre 5 y 45V, de 5 en 5 unidades.

En la siguiente tabla III.23 se puede ver el ion precursor que se ha tomado, el rango de masas que se va a adquirir en el tercer cuadrupolo, todas las transiciones en todos los voltajes posibles, es decir, 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40 y 45 V. Además de los iones hijos más intensos seleccionados.

Tabla III.23: Valores de adquisición del método en Product Scan.

Compuestos	Ion precursor	Rango de masa productos (uma)	Energía de colisión (V)	iones productos más intensos
Galaxolide Tonalide	258	40-258	5-45V (de 5 en 5)	243; 213;
	243	40-243	5-45V (de 5 en 5)	213; 143; 187; 159;
Almizcle xileno	282	40-282	5-45V (de 5 en 5)	91; 117; 265; 103; 77;
	297	40-297	5-45V (de 5 en 5)	282;
Almizcle ambreta	268	40-268	5-45V (de 5 en 5)	253; 251; 91;
	253	40-253	5-45V (de 5 en 5)	79; 91; 106; 223;
Almizcle cetona	279	40-279	5-45V (de 5 en 5)	117; 118; 91; 191;
	294	40-294	5-45V (de 5 en 5)	279; 146; 160; 117;

La figura III.26 es un ejemplo de la superposición de todos los valores de las energías de colisión, para romper el ión precursor 279 y obtener sus iones

productos. Se seleccionan los más intensos, que han sido descritos en la tabla anterior.

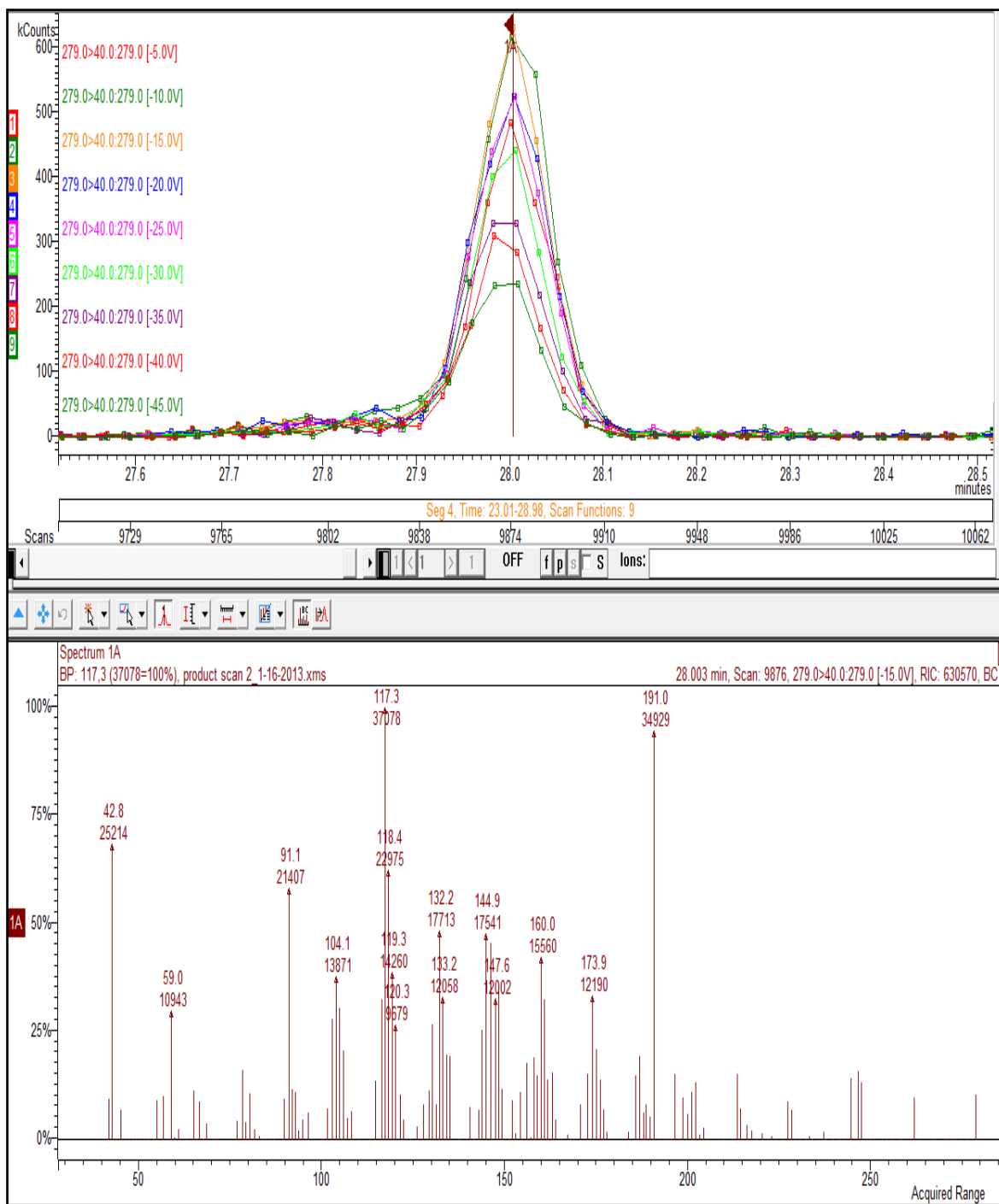


Figura III.26. Superposición de todos los voltajes de rotura y espectro de masas del más intenso.

De la figura III.26 se pueden sacar varias deducciones. En la parte superior de la figura se obtiene la superposición del ión precursor 279, en todas los voltajes, donde se observa que el color amarillo tiene la máxima intensidad

correspondiendo a 15V. En la parte inferior de la figura se obtiene el espectro de masas de la rotura del ion 279, que indica los iones hijos o productos para ese ión padre, donde los más intensos son el 117 y 191. Esto se realiza para todos los iones precursores seleccionados en la tabla III.23.

Después de la elección de los posibles iones productos, se seleccionan todo los iones precursores con todos los iones productos, es decir, todas las posibles transiciones de masas/masas cada uno de ellos en todas las energías de colisión para seleccionar la energía de colisión donde el ión producto tiene la máxima intensidad, con lo cual, mejor sensibilidad y mayor respuesta.

Se superponen todas las energías de colisión para cada transición, y se selecciona la de mayor respuesta, siguiendo el procedimiento para los iones precursores. Se pone como ejemplo la siguiente figura III.27.

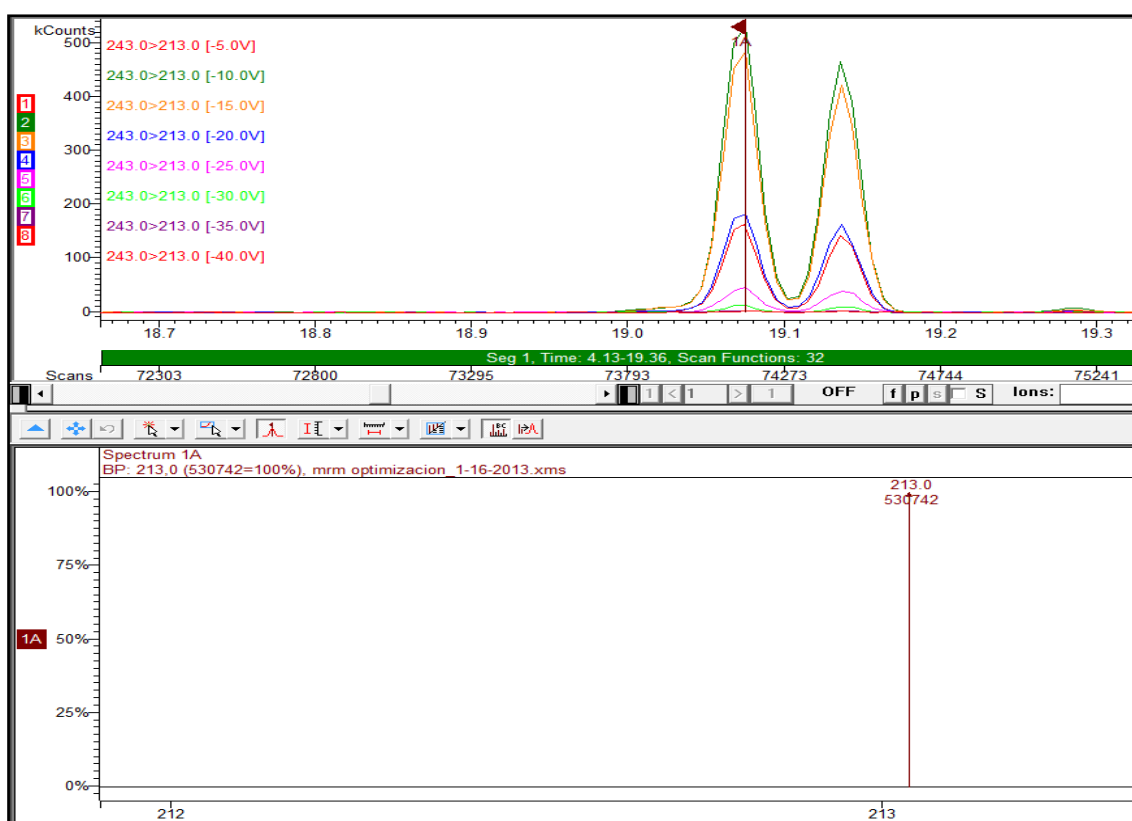


Figura III.27. Superposición de todos los voltajes de la transición 243-->213

En la figura III.27, el color verde es el más intenso que pertenece a 10 V, su espectro solo señala el único ión hijo, que ha sido seleccionado en la

transición, al ser una transición de masas/masas (243-->213). Este procedimiento se realiza para todas las transiciones seleccionadas, las cuales se indican en la Tabla III.24, con su energía de colisión óptima para cada una de ellas y el orden en el cual las transiciones son más sensibles.

Tabla III.24. Transiciones y energías de colisión óptimas

Fragancias	Adquisición			Resultados		
	Ion precursor	Ion producto	Energía colisión (V)	Intensidad obtenida	Energía colisión óptima	Orden
Galaxolide	243	143	5-45V (de 5 en 5)	350 kc	25 V	3°
	243	213	5-45V (de 5 en 5)	530 kc	10 V	1°
	258	213	5-45V (de 5 en 5)	150 kc	20 V	4°
	258	243	5-45V (de 5 en 5)	420 kc	10 V	2°
Tonalide	243	159	5-45V (de 5 en 5)	700 kc	15 V	3°
	243	187	5-45V (de 5 en 5)	1,5 Mc	10 V	2°
	258	187	5-45V (de 5 en 5)	520 kc	15 V	4°
	258	243	5-45V (de 5 en 5)	420 kc	10 V	1°
Almizcle xileno	282	77	5-45V (de 5 en 5)	65 kc	30 V	3°
	282	103	5-45V (de 5 en 5)	50 kc	25 V	6°
	282	117	5-45V (de 5 en 5)	65 kc	20 V	2°
	282	265	5-45V (de 5 en 5)	50 kc	10 V	4°
	282	91	5-45V (de 5 en 5)	80 kc	20 V	1°
	297	282	5-45V (de 5 en 5)	50 kc	10 V	5°
Almizcle ambreta	268	91	5-45V (de 5 en 5)	45 kc	30 V	7°
	268	251	5-45V (de 5 en 5)	53 kc	5 V	6°
	268	253	5-45V (de 5 en 5)	150 kc	10 V	2°
	253	79	5-45V (de 5 en 5)	125 kc	20 V	4°
	253	91	5-45V (de 5 en 5)	135 kc	25 V	3°
	253	106	5-45V (de 5 en 5)	160 kc	15 V	1°
	253	223	5-45V (de 5 en 5)	70 kc	5 V	5°
Almizcle cetona	279	117	5-45V (de 5 en 5)	210 kc	25 V	1°
	279	91	5-45V (de 5 en 5)	98 kc	40 V	5°
	279	118	5-45V (de 5 en 5)	185 kc	25 V	2°
	279	191	5-45V (de 5 en 5)	100 kc	10 V	3°
	294	146	5-45V (de 5 en 5)	35 kc	10 V	6°
	294	160	5-45V (de 5 en 5)	48 kc	10 V	4°
	294	191	5-45V (de 5 en 5)	5.5 kc	20 V	8°
	294	279	5-45V (de 5 en 5)	30 kc	10 V	7°

De la tabla III.24, se obtiene una recopilación de todas las transiciones estudiadas, en su modo óptimos de colisionar, aportando las mejores transiciones para cada compuesto que van a constituir el método final de MSMS.

6.2.5. MRM o MSMS

Las tres transiciones más sensibles (tabla III.24) para cada fragancia se han seleccionado para hacer el método de masas/masas. Sería suficiente con dos transiciones para cada compuesto, que sería un cuantificador y un cualificador. Pero cogiendo tres transiciones los dos cualificadores, verifican que el pico es el correcto ante cualquier duda. El cromatograma en MSMS, del método final se puede ver en la figura III.28 y la pantalla de adquisición del método final en la figura III.29.

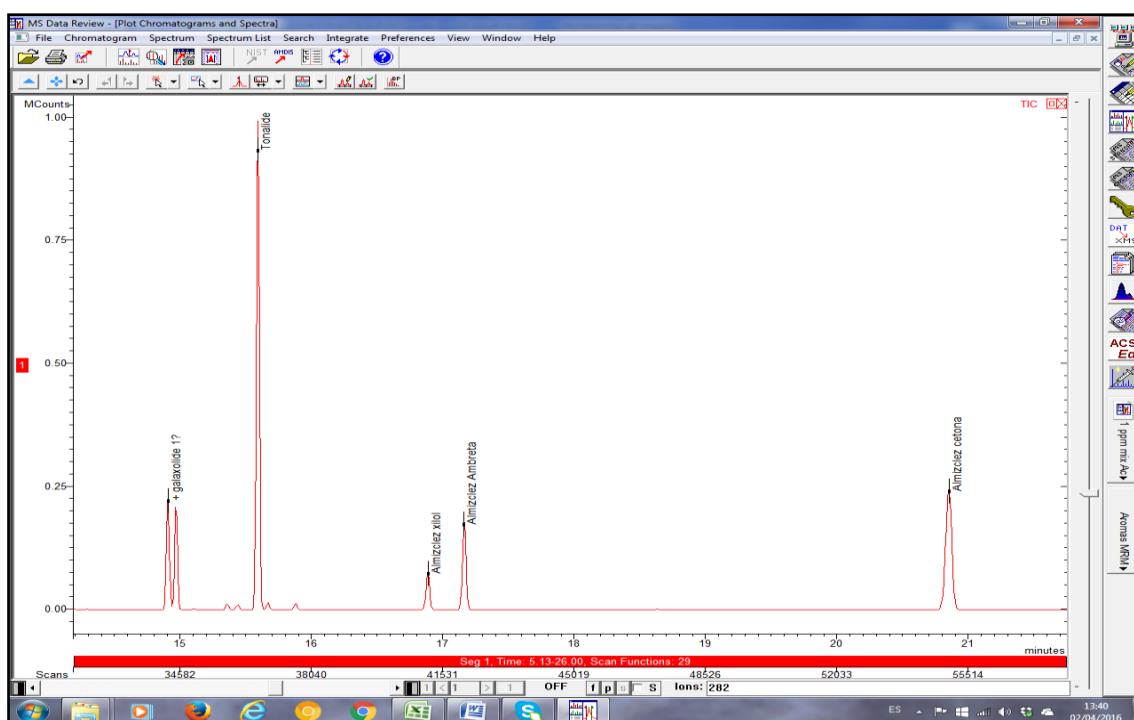


Figura III.28. Cromatograma de un patrón de 100 ppb en MSMS

The screenshot displays the 'Method Builder' software interface for configuring a mass spectrometry method. The title bar indicates the method name: 'SPME Aromas MRM v1 LVI menos transiciones recta optimizado2'. The interface is divided into several sections:

- Left Panel (Tree View):** Shows the method structure, including 'Method Notes', 'Configuration', 'Acquisition Method', 'Standard MS Reports', 'MS Data Handling', and '45X-GC' components.
- Method Specs Panel:**
 - Model: 320(GC)
 - Ionization: EI
 - Method run time: 24.5
 - Data type: Centroid
 - Collect delay: 5.0 Min.
 - Display collected file in Chro: checked
 - Detector: EDR Maximum, 1000.0 Volt
 - Detector off at method end: checked
 - Scan width in SIM and MRM mode: 0.70 amu
- Time Segment Panel:**
 - Time segment 1 of 1
 - Start at retention time: 0.00 Min.
 - Scan Function Validation: Enabled
 - Collect Data: checked
 - CID gas on: checked
 - Scan Time (in Seconds): 0.392
 - Mass peak width in amu: Quad 1: 2.5, Quad 3: 1.5
- Mass List Table:**

	CAS Number	Compound Name	Polarity	Q1 First Mass	Q1 Last Mass	Q3 First Mass	Q3 Last Mass	Capillary	Collision Energy	Req. Dwell Time
1		Galaxolide	Pos.	243.00		143.00			25.000	0.028
2		Tonalide	Pos.	243.00		159.00			15.000	0.028
3		Tonalide	Pos.	243.00		187.00			10.000	0.028
4		Galaxolide	Pos.	243.00		213.00			10.000	0.028
5		Musk Ambrette	Pos.	253.00		91.00			25.000	0.028
6		Musk Ambrette	Pos.	253.00		106.00			15.000	0.028
7		Tonalide-Galaxolide	Pos.	258.00		243.00			10.000	0.028
8		Musk Ambrette	Pos.	268.00		253.00			10.000	0.028
9		Musk Ketone	Pos.	279.00		117.00			25.000	0.028
10		Musk Ketone	Pos.	279.00		118.00			25.000	0.028
11		Musk Ketone	Pos.	279.00		191.00			10.000	0.028
12		Musk Xilol	Pos.	282.00		77.00			30.000	0.028
13		Musk Xilol	Pos.	282.00		91.00			20.000	0.028
14		Musk Xilol	Pos.	282.00		117.00			20.000	0.028
15			Pos.							
16			Pos.							
17			Pos.							
18			Pos.							

Figura III.29. Transiciones finales del método Masas/Masas

Se concluye que se obtiene un cromatograma con una línea base muy baja y en el cual solo se obtienen las transiciones seleccionadas para los compuestos objeto de estudio. Con una buena separación cromatográfica y selectividad. Los parámetros finales de adquisición del método de MSMS, se detallan en la figura III.36.

6.2.6. SCAN TIME

Un parámetro a tener en cuenta es el tiempo de escaneado (Scan Time) que se calcula experimentalmente sobre el cromatograma (figura III.30), tomando el pico más estrecho del cromatograma (normalmente el primero), calculando el rango de tiempo del ancho del pico, seleccionando desde el principio al final del pico, y el valor de la anchura del pico se divide entre 10, que son los puntos necesarios que se necesitarían para obtener pico con forma de campana de Gauss.

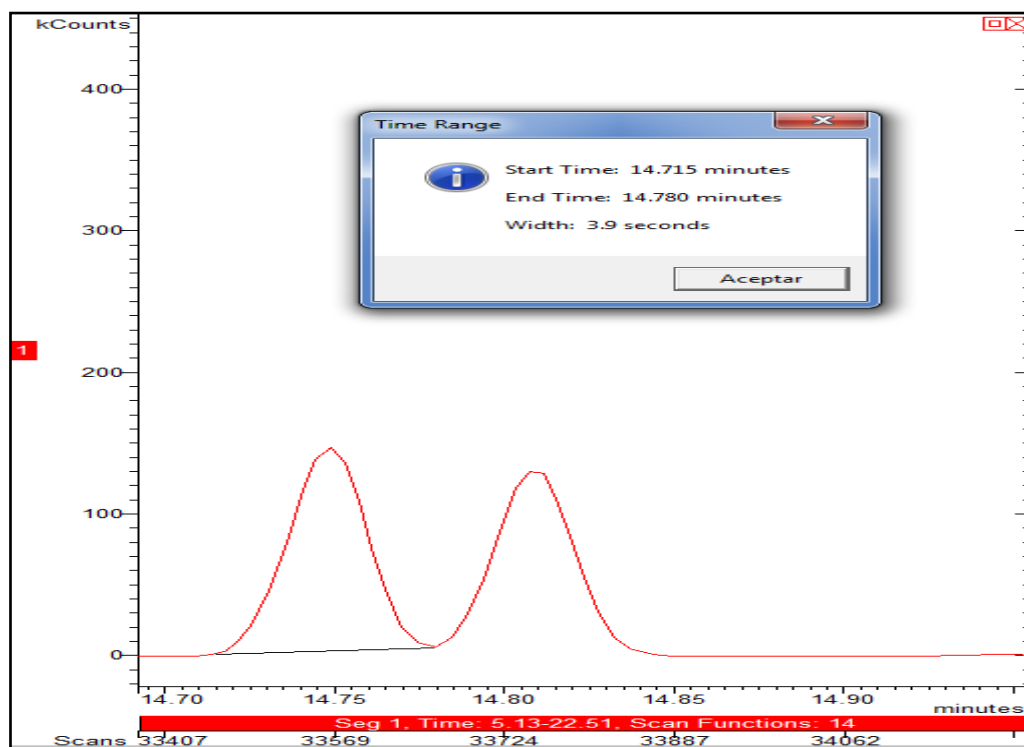


Figura III.30. Cálculo de valor de Scan time

Para este método el valor óptimo de Scan Time sería 0,39 segundos, esto significa que cada ese tiempo el equipo va a tomar un valor en el cromatograma de todas las transiciones del método, porque es el tiempo necesario para formar picos cromatográficos con forma gaussiana. Valor que se marca en la adquisición del método como se puede comprobar en la figura III.29.

A lo largo del apartado 6.2 se han desarrollado el método de MSMS, pasando por todas las opciones de adquisición posibles. Se podría trabajar también en Full Scan o en SIM (como hacen otros autores), pero MSMS se obtienen la mayor sensibilidad y selectividad de los compuestos.

6.3. Detección

En el detector se puede trabajar de dos formas diferentes. La primera mediante voltaje fijo, donde manualmente se van modificando los valores deseados. Si se tienen valores de voltaje demasiado bajos, los picos pequeños se pierden, y si son demasiado altos, el detector se saturará.

La segunda sería trabajar en un rango de voltaje variable: "Extended Dynamic Range (EDR)", que detecta el nivel de la señal de iones de cada transición, ajustando la tensión del detector y la ganancia percibida para mantener la salida de señal en el nivel óptimo para la detección. Manteniendo una buena linealidad y la calidad espectral de masas en el estándar de concentración más alto. Este modo de trabajo es una patente de los equipos de Bruker para este tipo de detectores.

La ventaja de la tecnología EDR es que hace automáticamente ajustes de la ganancia del multiplicador, en el sector tiempo. Si la señal es muy grande, la tensión de detector va hacia abajo para evitar la saturación. Si la señal es pequeña, la tensión se sube, por lo que detecta eficazmente los niveles de señal bajos.

Esta tecnología está comprobada y utilizada ampliamente. Por ejemplo para el desarrollo de la norma ASTM D5769, un método comúnmente utilizado en las refinerías para cuantificar compuestos orgánicos volátiles en la gasolina, que

normalmente se encuentran en concentraciones muy altas. Esto hace que se cumplan los criterios de linealidad y amplio rango dinámico, como exige la norma sin intervención del operador o cambios en el procedimiento del método.

Se decide usar el modo de detección EDR, en el método que se está optimizando, debido a las grandes ventajas y avances que presenta. El modo de trabajo con voltaje fijo, no se suele usar en la actualidad con este tipo de equipos.

7. Recopilación de los procedimientos de optimización realizados

Se empezó este capítulo III comprobando cual de los procedimientos de preparación de muestras sería más adecuado para el problema analítico que se estaba planteando, evaluando las extracciones LLE, SPE y SPME, llegando a la conclusión que esta última sería la más idónea para este análisis.

Este tipo de extracción SPME, está condicionada por una serie de parámetros que pueden optimizarse para los compuestos estudiados y así obtener su máxima eficacia. Llegándose a las siguientes conclusiones:

- Que la fibra más apropiada es la de PDMS/DVB, de color azul con 65 μm de grosor.
- Que la adición de 2 gramos de NaCl, favorece la extracción de los compuestos.
- El volumen de llenado de muestra en el vial es mejor si es de 10 ml.
- El tiempo de incubación es de 30 min.
- La temperatura de incubación de 100 °C.
- El tiempo de desorción de la fibra de 5 min.
- Y que un pH neutro es lo más adecuado para la medida.

Los parámetros de inyección e introducción de la muestras son los indicados para el tipo de extracción seleccionados como es la SPME: temperatura de desorción de la fibra a 250 °C, rampa de splitless y liner de diámetro interno pequeño para SPME. Aunque la optimización del método de adquisición siempre ser realiza

con inyección líquida, una vez seleccionadas las transiciones de MSMS, los parámetros del inyector son los de SPME (tabla III.11).

Para el procedimiento cromatográfico, se eligió una columna Br-sWAX y una rampa de temperatura descrita en la tabla III.19, consiguiendo una separación cromatográfica buena de los compuestos sin solapamiento, incluso la de los enantiómeros más abundantes del galaxolide.

A continuación se han desarrollado paso a paso el método de adquisición de MSMS, desarrollando y optimizando minuciosamente cada una de sus etapas: full scan, SIM, Product Scan y MRM. Llegando a las transiciones reflejadas en la figura III.29 y calculando el Scan time idóneo para este método de 0.39 segundos.

Por último, se eligió trabajar con el detector en modo EDR, al ser una tecnología más moderna y avanzada que optimizar automáticamente la ganancia del detector teniendo en cuenta la respuesta de cada almizcle.

El procedimiento detallado del método optimizado que se valida y es aplicado a muestras reales se describe en el capítulo II.

CAPÍTULO IV

VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA

1. Introducción

Una vez optimizado el método, se procede a validarlo. Existen diferentes definiciones de validación (Cuadros et al., 2003). Según el vocabulario internacional de metrología (VIM) (JCGM 200:2008), "la validación es una verificación dirigida a comprobar determinados requisitos relacionados con un uso específico". Esta definición es equivalente a la que aparece en la norma UNE-EN ISO 9000 (2005) que dice: "Confirmación mediante la aportación de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos para la utilización o aplicación específica prevista".

Desde un punto de vista analítico, pueden citarse estas definiciones de la norma ISO 17025 ("Confirmación mediante el examen y la aportación de evidencias objetivas de que se han cumplido los requisitos particulares para una aplicación específica prevista" y de la Guía de Eurachem ("Proceso, basado en estudios sistemáticos de laboratorio, mediante el cual se pone de manifiesto que un método analítico determinado posee unas características de funcionamiento adecuadas a la aplicación que se le quiere dar").

El objetivo que se persigue con la validación es conocer el comportamiento de todas las variables analíticas del método con miras a evaluar si es apto para el uso previsto. En el presente trabajo de investigación, estas variables serían:

- Parámetros de calidad de la separación cromatográfica
 - Parámetros de retención
 - Factor de capacidad
 - Resolución
 - Eficacia
- Parámetros de calidad de la determinación analítica
 - Selectividad / especificidad
 - Linealidad y rango de trabajo
 - Veracidad

- Exactitud
- Precisión
- Límites de detección y cuantificación
- Robustez
- Incertidumbre

La validación del método en este caso incluye a su vez el proceso de tratamiento de muestra (incubación, extracción y desorción) al estar automatizado. Además, se realiza la validación en las diferentes matrices estudiadas (agua de río, agua de mar y aguas residuales). Para el proceso de validación, se adquirieron patrones de cada uno de los almizcles con sus concentraciones certificadas, se han resumido los datos en la tabla IV.1 y los certificados de cada patrón en el anexo A.

Tabla IV.1. Datos de los patrones certificados

Almizcles	Concentración (mg/L)	Incertidumbre* (%)	Pureza (%)	Peso (mg)	Volumen (ml)	Disolvente
HHCB	10,000	± 10,0	55,8	1,797	100,00	Ciclohexano
AHTN	10,000	± 2,0	98,5	1,017	100,00	Ciclohexano
MA	10,000	± 2,0	99,0	1,014	100,00	Ciclohexano
MK	10,000	± 2,0	98,0	1,023	100,00	Ciclohexano
MX	10,000	± 5,0	99,0	1,015	100,00	Ciclohexano

*Calculado mediante la guía EURACHEW/CITAC (95%, K=2).

Se ha tomado como referencia para el proceso de validación la Guía SANTE/1945/2015 (que se corresponde con la antes denominada Guía SANCO 12571/2013) sobre procedimientos de validación y control de calidad de métodos de análisis de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos. Esta norma cumple todos los criterios descrito en la UNE-EN ISO/IEC 17025:2005, sobre los requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración. Igualmente, se han tomado como referencia los criterios que establece dicha guía para los criterios de aceptación para considerar validado un parámetro. Para los parámetros objeto de estudios en esta Tesis Doctoral son los que se describen a continuación:

- Parámetros de retención: se permite una variación de ± 0.1 min sobre el tiempo de retención de los compuestos.
- Selectividad/especificidad: se necesita como mínimo un ión cuantificador y otro cualificador, para la identificación correcta en un detector de espectrometría de masas triple cuadrupolo, con una desviación $\leq 30\%$ en la relación de proporcionalidad de iones seleccionados.
- Linealidad: se debe usar un mínimo de cinco niveles de calibración, los cuales no tenga un nivel de residuales que supere un valor de $\pm 20\%$.
- Veracidad o sesgo: se debe obtener recuperaciones dentro del rango entre 70 y 120 %, sobre muestras dopadas.
- Exactitud y precisión: deben tener un porcentaje de desviación estándar relativa $\leq 20\%$, tanto para la repetitividad como para la reproducibilidad dentro del laboratorio.
- Robustez: se considera correcta, si cumple que la desviación estándar relativa tenga los mismos criterios que la reproducibilidad o precisión intermedia.

En la tabla IV. 2. se resumen los criterios de validación que se han tenido en cuenta a lo largo de este capítulo.

Tabla IV. 2. Criterios de validación

Parámetros de validación	Criterios de aceptación
Tiempo de retención	$\pm 0,1$ min; RSD-Tr $\leq 1\%$
Factor de capacidad	$1 \leq K \leq 5$
Factor de selectividad	$\alpha \geq 1$
Factor de resolución	RES $\geq 1,5$
Factor de asimetría	T ~ 1
Nº de plato teórico	> 2000
Selectividad/especificidad	1 ión cuantificador + 1 ión cualificador; (RSD $\leq 30\%$)
Linealidad	5 niveles de calibración; Valor de residuales $\leq 20\%$,
Veracidad o sesgo	Rango de recuperaciones entre 70 y 120 %
Exactitud y precisión	RSD $\leq 30\%$
Robustez	RSD $\leq 30\%$

En los apartados siguientes se describen los resultados obtenidos en la validación de los diferentes parámetros.

2. Parámetros de calidad de la separación cromatográfica

En este apartado se evalúan los parámetros necesarios para obtener una buena separación cromatográfica de los compuestos en la columna (Jurado, 2008; Martín, 2012).

2.1. Parámetros de retención y factor de capacidad

Los parámetros de retención vienen definidos por el tiempo en el que los analitos se encuentran retenidos en la columna. Para evaluar estos parámetros se tendría que tener en cuenta las siguientes definiciones:

Tiempo muerto, T_m : tiempo requerido para que una especie no retenida atravesase la columna y llegue al detector.

Tiempo de retención, T_r : tiempo transcurrido desde la inyección de la muestra hasta que el componente llegue al detector.

También se evalúa la variación del tiempo de retención en la medida repetitiva de muestras, indicándola como % RSD- T_r . Este valor debe ser menor del 1%.

El factor de capacidad, K' , indica la mayor o menor retención de un componente en la columna. Es la relación entre el tiempo que las moléculas de analito están en la fase estacionario y el que están en la fase móvil. Es un valor constante y característico de cada analito.

$$k' = (T_r - T_m) / T_m.$$

El criterio de aceptación para los valores del factor de capacidad es: $1 < k < 5$

El factor de capacidad, K' , está relacionado con el factor de selectividad, α , que indica la capacidad de una determinada fase estacionaria para separar dos componentes (A y B).

$$\alpha = K_b / K_a \quad \text{si } \alpha > 1 \text{ los compuestos se encuentran bien separados.}$$

Para el cálculo de estos valores se ha tomado un patrón de 100 ng/L de todos los compuestos, que se ha medido 5 veces. Se han obtenido los valores que figuran en la Tabla IV.3.

Tabla IV.3. Parámetros de retención de los diferentes compuestos

P. Retención	HHCB 1	HHCB 2	AHTN	MX	MA	MC
1	14,566	14,626	15,255	16,522	16,783	20,203
2	14,564	14,624	15,253	16,512	16,777	20,217
3	14,565	14,626	15,257	16,521	16,785	20,206
4	14,565	14,627	15,256	16,527	16,776	20,204
5	14,565	14,625	15,255	16,526	16,779	20,195
Tr (min)	14,565	14,626	15,255	16,533	16,78	20,205
SD (min)	0,001	0,001	0,001	0,006	0,004	0,008
RSD-Tr (%)	0,0049	0,0078	0,0097	0,036	0,0231	0,0391
K'	4,826	4,8504	5,102	5,6088	5,712	7,082
α	1,005	1,052	1,099	1,018	1,24	ultimo pico

En los resultados se observa que el tiempo de retención, no se acerca a una variación de $\pm 0,1$ min, no llegando a valores ni de 0,01 min. Esta comprobación también se observa con los pequeños valores de SD y RSD-Tr.

Se puede comprobar que todos los compuestos son retenidos correctamente en la columna al tener valores de K' superiores a 1, aunque se obtienen valores algo superiores a 5, que indicarían que los compuestos se quedan más tiempo retenidos en la columna de lo que sería su valor optimo. No obstante, son valores aceptables, que solo influirían en una duración del cromatograma algo superior. El factor de selectividad también es mayor a la unidad, indicando una buena separación entre los compuestos en la columna. Un ejemplo de cromatograma se ha visto en la figura.III.28 del capítulo anterior.

Los resultados anteriores están conformes con los criterios de aceptación que se han establecido anteriormente para la validación de estos parámetros.

2.2. Parámetros de resolución

Estos parámetros son una medida del grado de separación entre dos picos consecutivos. Se pueden evaluar dos factores:

- Factor de resolución, Res, definido como el cociente de la distancia entre los centros de las dos bandas y el valor medio de la anchura (W) de las mismas.

La resolución puede observarse directamente sobre el cromatograma. Se tendrá una buena resolución si los picos no se solapan, y está perfectamente delimitado cada pico, sin que coincida el final de uno con el principio del siguiente. Matemáticamente viene dada por la expresión:

$$\text{Res} = (Tr_b - Tr_a) / ((W_a + W_b) / 2) .$$

Si los valores de Res son $\geq 1,5$; se considera que los picos están bien resueltos.

- Factor de asimetría (T), que mide el grado de similitud del pico a una curva gaussiana. Donde A y B representan la distancia entre los dos extremos inferiores del pico y la vertical que pasa por el máximo, es decir, el tiempo del final del pico menos el tiempo de retención, dividido entre el tiempo de retención menos el tiempo inicial . Los picos se consideran más simétricos cuando su valor se aproxima a 1.

$$T = B / A .$$

Los resultados obtenidos para los diferentes compuestos figuran en la Tabla IV.4.

Tabla IV.4. Valores del factor de resolución y asimetría

Compuestos	Res	T
HHCB 1	--	0,9355
HHCB 2	0,81	1,2222
AHTN	8,36	1,1212
MX	18,95	1,0313
MA	3,84	1,0833
MC	46,73	0,8293

Visualmente se observa que los picos están bien separados (Figura III.28), aunque para el galaxolide el pico se encuentra desdoblado no encontrándose totalmente resuelto el galaxolide 1 y 2. Esto también se detecta en los valores de la tabla IV.4 donde el valor de resolución entre HHCB 1 y HHCB 2, es de 0.81, no siendo superior a 1,5. Los valores del factor de asimetría se encuentra próximo a 1 en todos los casos, obteniéndose picos bastantes simétricos.

Los resultados anteriores cumplen los criterios de aceptación mencionados anteriormente para la validación de estos parámetros.

2.3. Parámetros de eficacia

Para calcular la eficacia de una columna, se tiene que explicar la Teoría del Plato Cromatográfico (Harris, 1999), desarrollada en 1941 por A.J.P Martin y R.L.M. Synge (Premio Nobel de Química en 1952). Según esta teoría una columna de longitud L se divide en N estratos imaginarios llamados platos teóricos. En cada plato teórico se produce un equilibrio de reparto del analito entre la fase móvil y la estacionaria. La altura equivalente de platos teóricos se expresa matemáticamente como:

$$H = L / N$$

Las columnas se comportan como si tuvieran distintos valores de N para los distintos analitos de la mezcla. Si aumenta N, disminuye H o aumenta L, por tanto aumenta la eficacia. El valor de número de platos teóricos debe ser superior a 2000, para considerarse válida la separación de los compuestos en la columna.

El número de platos teóricos, N, se calcula según esta expresión:

$$N = 16 (Tr / W)^2$$

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla IV.5.

Tabla IV.5. Cálculo del número de plato teórico.

Compuestos	Nº de plato teórico
HHCB 1	821.115
HHCB 2	546.564
AHTN	775.708
MX	1.055.140
MA	818.277
MC	1.190.717

El número de plato teórico es superior a 2000 para todos los compuestos, con lo cual la columna daría una buena separación cromatográfica de los almizcles y está de acuerdo con los criterios de aceptación citados anteriormente para los distintos parámetros.

2.4. Resumen y conclusiones de la validación de los parámetros de separación cromatográfica

Resumiendo los resultados de los parámetros de calidad obtenidos se ajustan bastante bien a los valores que caracterizan una buena separación cromatográfica. La desviación estándar relativa de los tiempos de retención fue

inferior a 0,0391 % en todos los casos y la variación del tiempos de retención fue inferior a $\pm 0,1$ min. Los factores de capacidad oscilaron entre 4,826, para el galaxolide 1, y 7,082 para el Almizcle cetona. El factor de selectividad también se cumple siendo superior a la unidad para todos los compuestos. La resolución mínima es superada en todos los casos, menos en el Galaxolide 1 y 2, donde la separación no es completa en la columna BR-sWax para los dos enantiomeros del compuesto, en otra columna como la VF-5MS solo se observa un pico de Galaxolide. Los valores de los factores de asimetría son próximos a 1 en todos los compuestos. Por último, los valores de número de platos teóricos son superiores a 546.564 en todos los casos.

3. Parámetros de calidad de la determinación analítica

3.1. Selectividad / especificidad

La definición de la IUPAC (Verbić et al.,2013), para la selectividad (SANCO/10684/2009) de un método analítico, es la extensión en la cual un método puede ser utilizado para detectar o determinar analitos concretos en mezclas y matrices sin la interferencia de otros componentes de comportamiento similar.

La especificidad se define como la capacidad de un método analítico para distinguir inequívocamente un determinado analito que va a ser detectado y/o determinado entre otros componentes de comportamientos similares.

En este trabajo de investigación se ha utilizado el análisis mediante cromatografía de gases con espectrometrías de masas triple cuadrupolo, siendo una combinación muy potente para la identificación de un analito en un extracto. Los resultados que proporciona esta técnica simultáneamente son tiempo de retención, (igual que en cualquier método cromatográfico), más las transiciones características de cada compuestos y además de que esos iones característicos tienen que cumplir una relación proporcional entre ellos para

que se puedas identificar inequívocamente el compuesto (se hace referencia a los datos de abundancia de cada ión).

Como se ha descrito anteriormente en capítulos anteriores, para la identificación de los compuestos se han seleccionado tres transiciones, en la cual una de ellas es el cuantificador y dos cualificadores, todos ellos tienen que salir al mismo tiempo de retención y tienen que mantener una relación de iones concretas concordante con su espectro de masas (ver Capítulo II). Según la tabla 3 de la Guía SANCO 10684/2009, sería suficiente con dos iones, es decir, un cuantificador y un cualificador, para un detector como el usado en este trabajo.

En el software, donde se crean las condiciones del método cromatográfico, existe un apartado para la identificación de los compuestos llamado "tabla de compuestos" donde se definen los parámetros característicos de todos los compuestos, como son: datos de identificación, tiempo de retención, iones característicos, puntos de calibración, rango de integración, espectro de masas, relación entre los iones, etc. Alguno de estos datos se puede visualizar en las figuras IV.1 y figura IV.2.

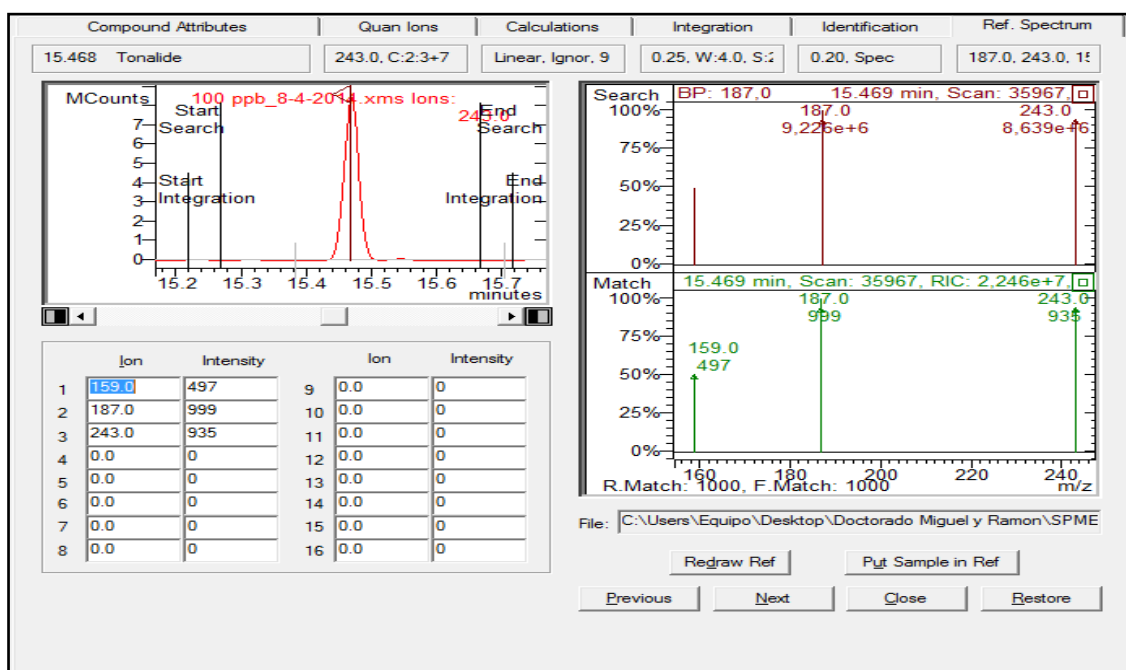


Figura IV.1. Comparación de espectros de masas con el de referencia.

En la figura IV.1, se aprecia en la parte derecha de la figura dos espectros, uno es el de referencia (teórico) y el otro que se ha adquirido de una muestra desconocida. Al adquirir la muestra y aparecer un pico cromatográfico al mismo tiempo de retención que por ejemplo el tonalide, los parámetros que se han introducido en el método para su identificación se empiezan a comparar con ese compuesto desconocido. 1º.- compara gráficamente su espectro de masas con el teórico (es como la radiografía del compuesto), donde se puede observar que tiene los mismos iones y con la misma intensidad.

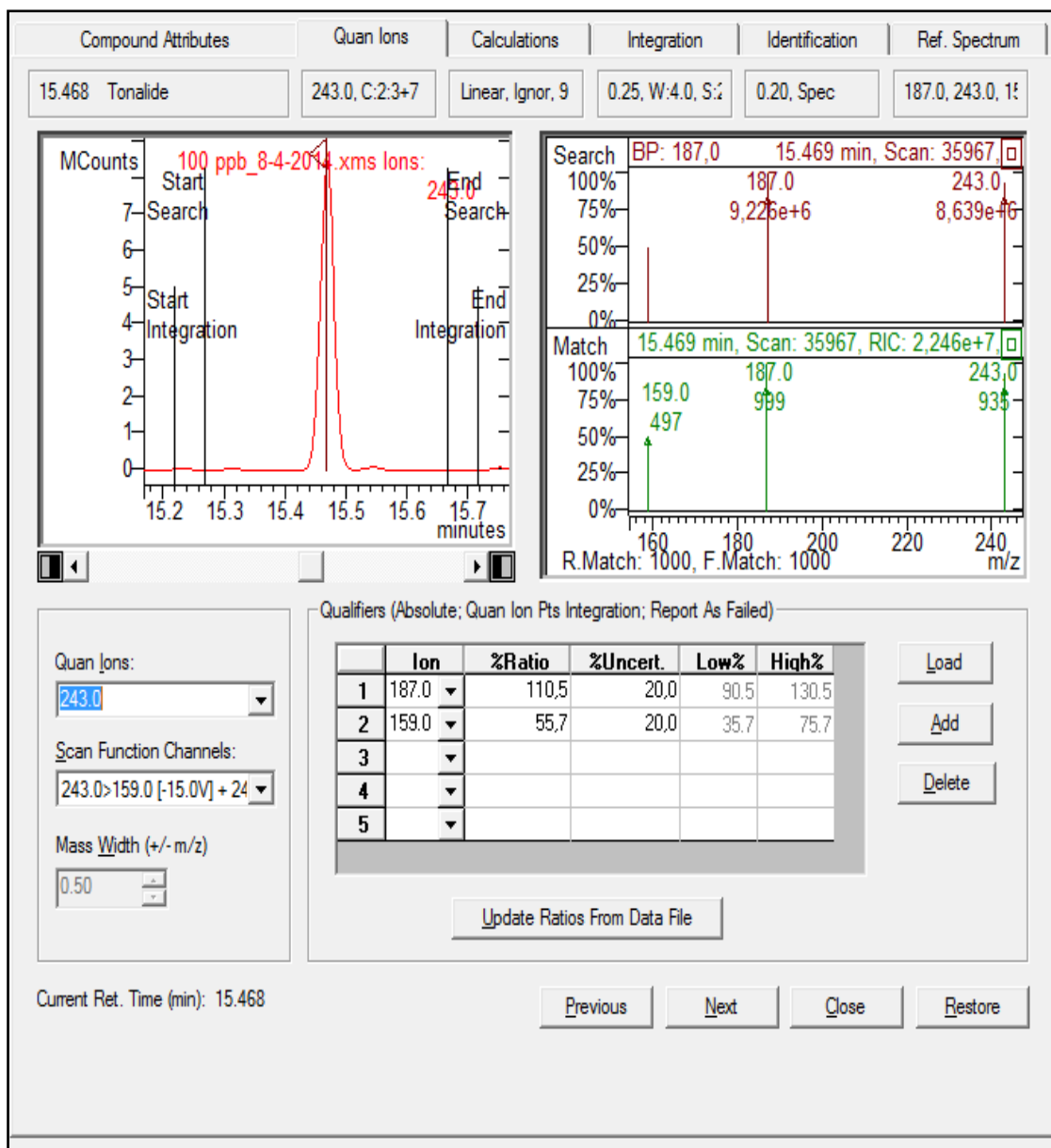


Figura IV.2. Parámetros de identificación de compuestos (tabla de compuestos)

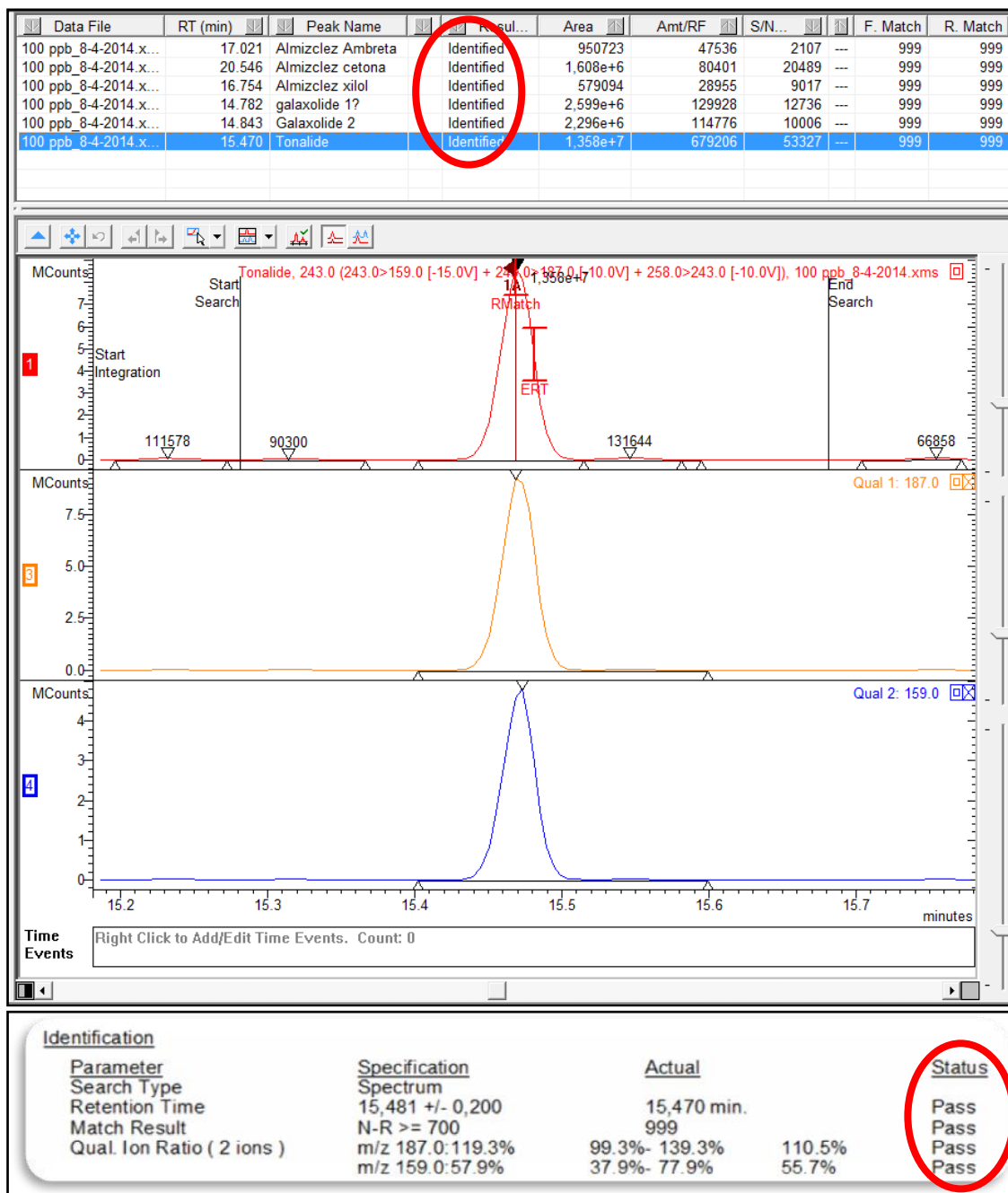


Figura IV.3. Pantalla de cuantificación de compuestos.

2º.- En la parte izquierda inferior (figura IV.1) aparecen los datos teóricos del espectro, ya en formato numérico, estos datos son necesarios para calcular la tolerancia de la figura IV.2, donde en la tabla que se encuentra en su interior se observan los dos iones cualificados (187 y 159) y la relación que deben de guardar con el ion cuantificador, que en este caso sería el 243. Esta relación viene calculada tomando la intensidad del ión 243 como el 100%, y haciendo la proporción de intensidades entre este y los iones 187 y 159, se calcula el % de

abundancia que deben cumplir para que se considere que es el tonalide. El porcentaje de incertidumbre o tolerancia (sobre los datos calculados) que se ha tomado como válida es del $\pm 20 \%$, aunque este se podría haber aumentado hasta 30%, según los criterios de validación de la guía SANTE. Todos estos parámetros se seleccionan en el método y después cuando se cuantifican las muestras. El software indica si la muestra es identificada o no, como se puede ver en la figura IV.3.

En la figura IV.3, se observa que los tres iones salen en el mismo tiempo de retención como es lógico al pertenecer al mismo compuesto. En la tabla superior de la imagen aparece que los compuestos están identificados. Eso es debido a que se cumplen todos los parámetros de especificidad que se han especificado en el método y que aparecen un informe de las condiciones en la tabla inferior "Pass". La comparación entre el espectro y la referencia es de 999 sobre 1000%. Concluyendo que el compuesto es el que se ha identificado como tonalide.

También recordar que la influencia del CINA, sobre los almizcles fue descrita en el capítulo de optimización, siendo un estudio de selectividad, en el cual a diferentes valores de sal, los compuestos presentaban más o menos sensibilidad en su detección, obteniendo mejores valores al añadir 2 g de CINA.

En base a estos resultados se considera validada la selectividad y especificidad del método analítico al cumplir todos los parámetros seleccionados.

3.2. Linealidad

La linealidad se define como la capacidad de un método analítico para generar una señal cuya intensidad sea directamente proporcional a la cantidad de un analito o parámetro analítico dado. En el estudio de la linealidad se realizaron las curvas de calibración preparando cada punto de patrón por triplicado.

Cada recta de calibrado contiene como mínimo 8 puntos de calibración en un rango de concentraciones entre 2 y 250 ng/L. Los resultados obtenidos de las áreas de pico para cada concentración de patrón fueron tratados mediante la técnica de regresión lineal mediante la cual se obtiene la ecuación de calibración $y = bx + a$, donde "b" es la pendiente y "a", la ordenada en el origen. Para calcular estos parámetros se utiliza el método de mínimos cuadrado, que consiste en ajustar estos parámetros para minimizar la suma del cuadrado de los residuales.

Para poder aplicar este método se debe considerar que no existe error en la variable "x", siendo este considerado sólo en la variable "Y" cuyo error aleatorio se obtiene a partir de la varianza calculada de los valores replicados. Además, dicha varianza debe permanecer constante en los distintos niveles (homocedasticidad) y los valores de "y" deben estar normalmente distribuidos en cada nivel.

Las ecuaciones para calcular la pendiente y ordenada en el origen son:

$$b = \frac{\sum_{i=1}^n \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

x_i : valores de la variable x;

y_i : valor medido de la variable y.

\bar{x} media muestral de x.

\bar{y} media muestral de y.

n: número de medidas.

Los errores de estos parámetros se calculan a partir de la varianza de regresión $(S_{y/x})^2$, que estima los errores aleatorios en la dirección y.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$$

Donde:

$$\hat{y}_i = a + bx_i$$

A partir de esta se tiene la desviación estándar de la pendiente (S_y) y de la ordenada (S_a):

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_i^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i^n x_i^2}{\sum_i^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

El último parámetro que se considerará es el coeficiente de correlación, r , que da cuenta de la bondad del ajuste de la curva a los datos experimentales. Su valor oscila entre 0 y 1, valores de r próximos a 1 implican un mejor ajuste.

$$r = \frac{\sum_i^n \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sqrt{\left[\sum_i^n (x_i - \bar{x})^2 \right] \left[\sum_i^n (y_i - \bar{y})^2 \right]}}$$

En las figuras IV.4. a IV.13, se representan las rectas de calibrado para cada almizcle. En la primera gráfica de cada uno de ellos aparecen representadas las tres rectas de calibrado de diferentes días individualmente con sus correspondientes ecuaciones de la recta (figuras IV.4,6,8,10,12). En la segunda gráfica para cada compuesto se representan la suma de todos los valores para obtener la recta de calibración media (figura IV.5,7,9,11,13). En cada una de las distintas gráficas se indican la ecuación de la recta de regresión y el coeficiente de correlación (r).

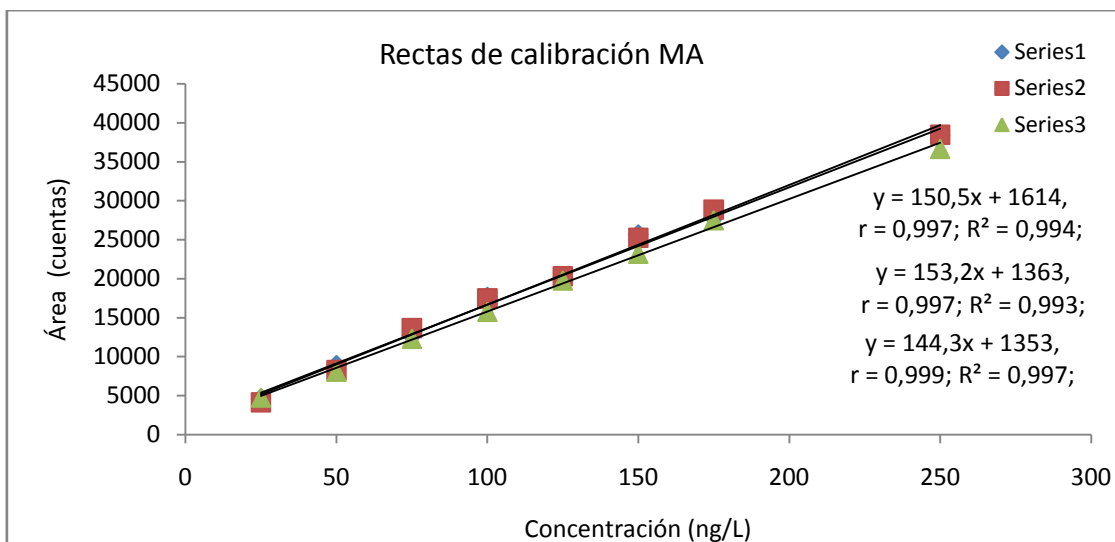


Figura IV.4. Representación de las rectas de calibrado de MA en tres días distintos.

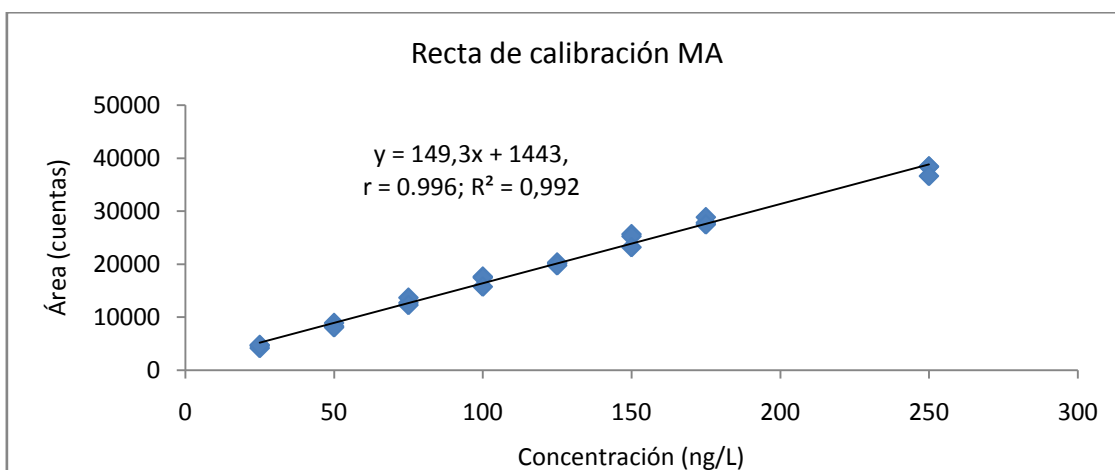


Figura IV.5. Representación de la recta de calibrado media de MA.

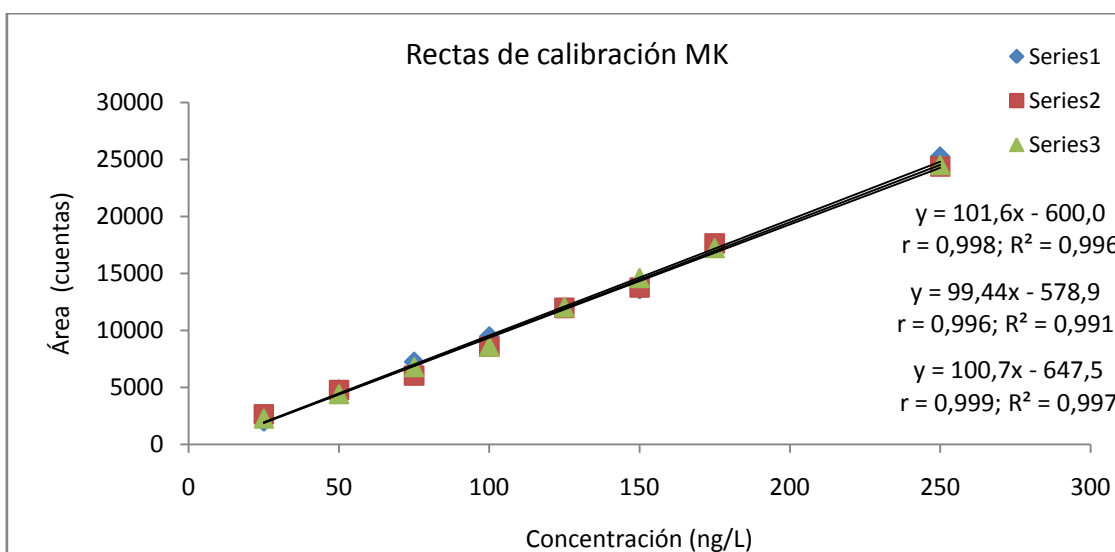


Figura IV.6. Representación de las rectas de calibrado de MK en tres días distintos.

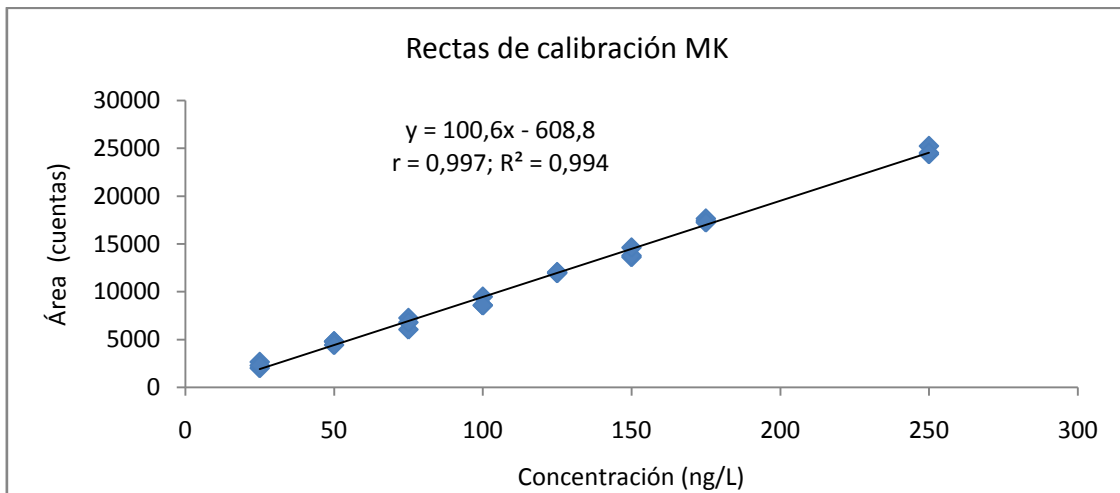


Figura IV.7. Representación de la recta de calibrado media de MK

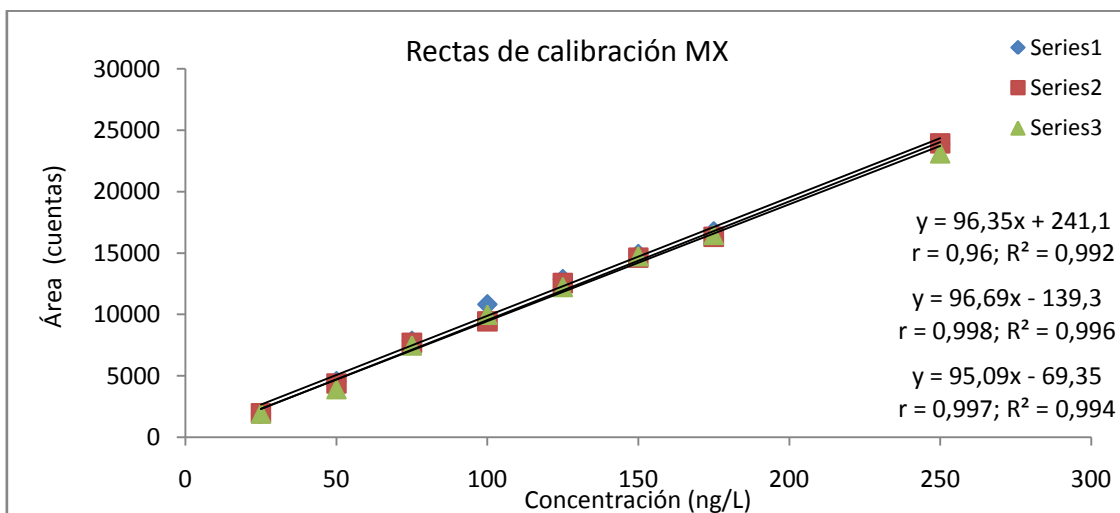


Figura IV.8. Representación de las rectas de calibrado de MX en tres días distintos.

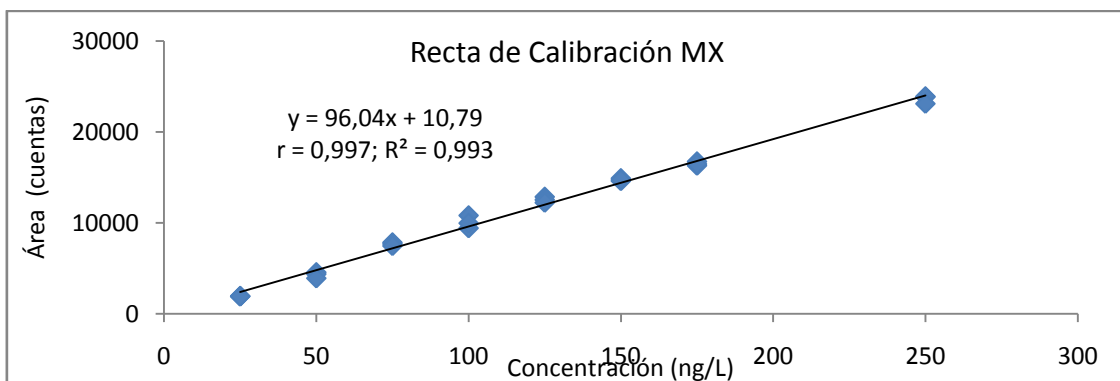


Figura IV.9. Representación de la recta de calibrado media de MX

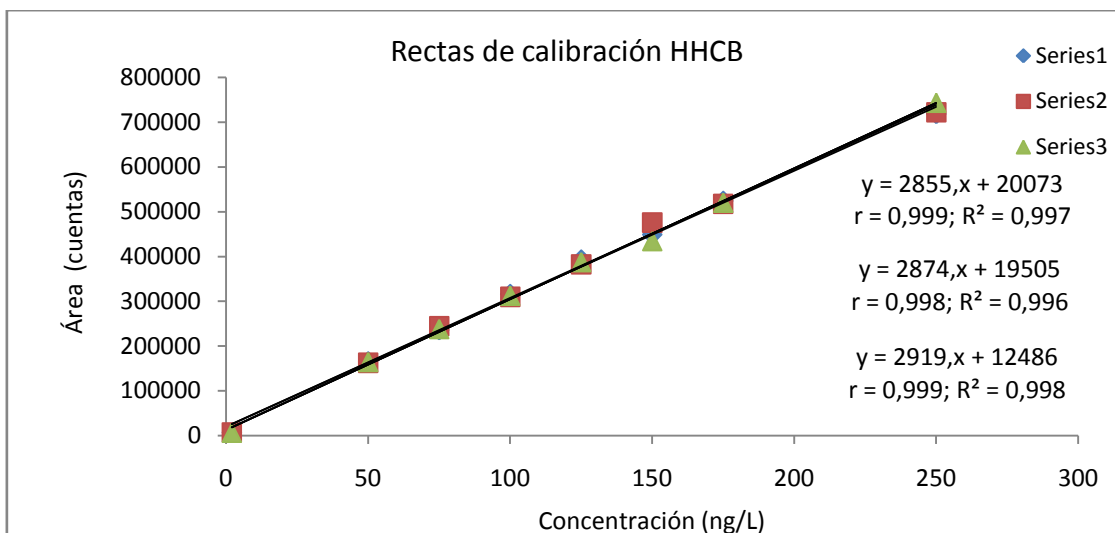


Figura IV.10. Representación de las rectas de calibrado de galaxolide en tres días distintos.

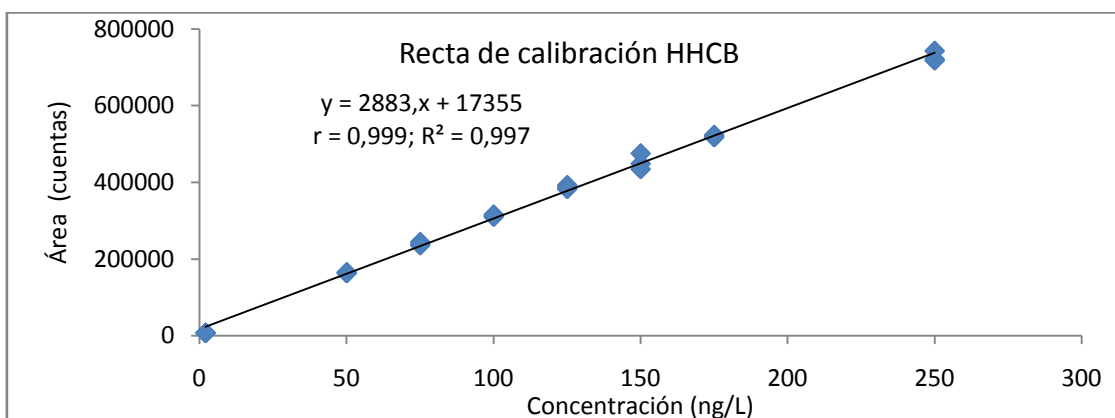


Figura IV.11. Representación de la recta de calibrado media de HHCB

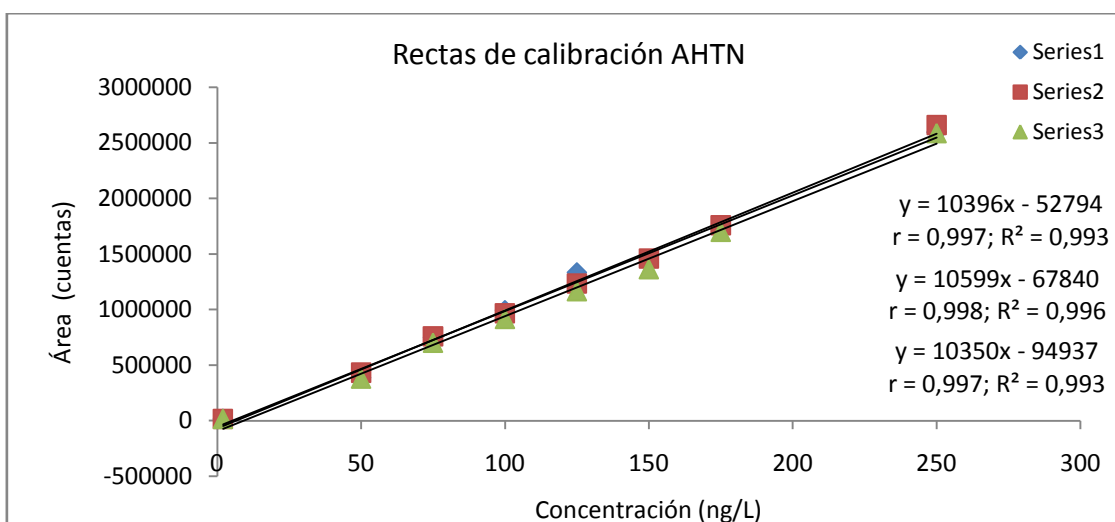


Figura IV.12. Representación de las rectas de calibrado de tonalide en tres días distintos

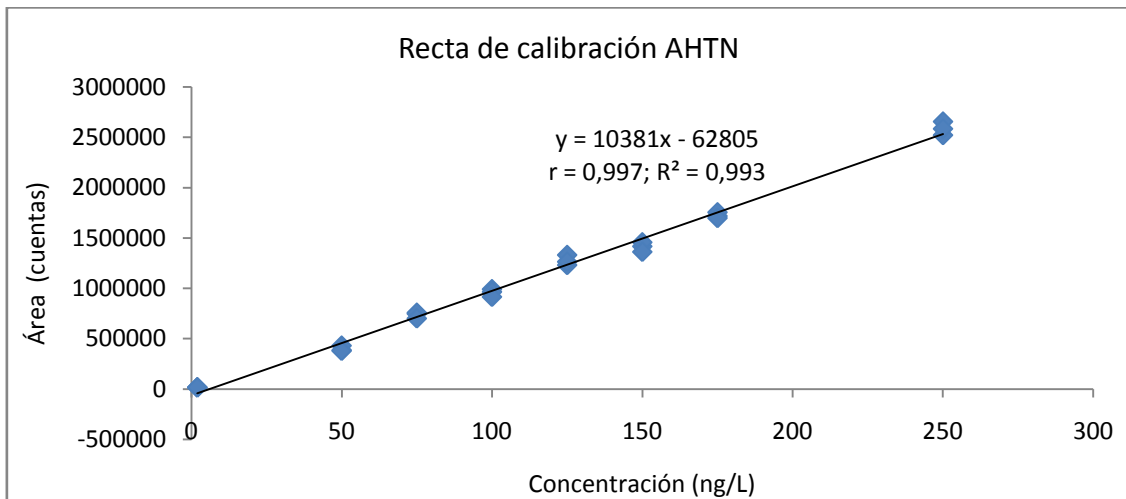


Figura IV.13. Representación de la recta de calibrado media de AHTN

Los valores de a, b, r y de otros parámetros que se tratan a continuación, aparecen recopilados en la tabla IV.7.

En la actualidad existen algunas discrepancias sobre los criterios a tener en cuenta para validar o comprobar la linealidad de un método (Raposo, 2016). En el presente trabajo de investigación, se han tenido en cuenta los siguientes criterios: coeficiente de correlación, porcentaje de linealidad, gráficos de residuales, análisis de varianza de residuales y factores de respuesta o sensibilidad.

A. Coeficiente de correlación. Se considera lineal el calibrado si $r > 0.99$. Como se ha podido observar en las graficas anteriormente representadas los valores de r en todos los casos son superiores a 0,996, lo cual indica una buena linealidad para todos los compuestos.

B. Porcentaje de linealidad. Se basa en que la desviación estándar relativa de la pendiente no supere el 5%. Esta es la conocida como linealidad. El porcentaje de linealidad se calcula como:

$$\%Lin = 100 \left(1 - \frac{s_b}{b} \right)$$

Como puede observarse en la Tabla IV.7. para todos los compuestos estudiados se obtienen un porcentaje de linealidad superior al 95 %, considerándose validado también este parámetro según este criterio.

C. Gráficos de residuales. A la desviación entre cada valor de y_i y su estimación, se le llama residual. Se han representado en las figuras IV.14 a IV.18 los valores de los residuales frente a la concentración para los distintos compuestos.

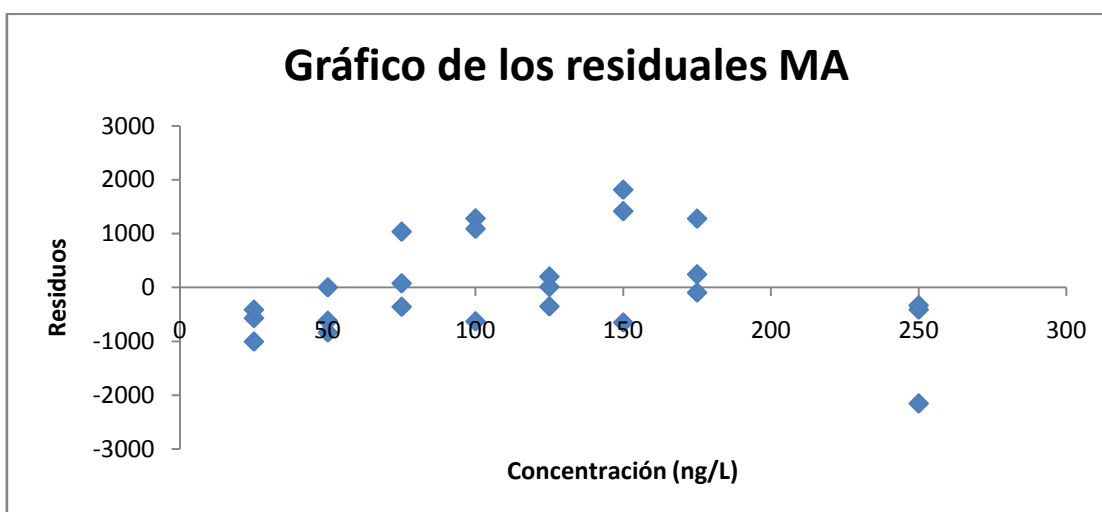


Figura IV.14. Representación del gráfico de los residuales del MA

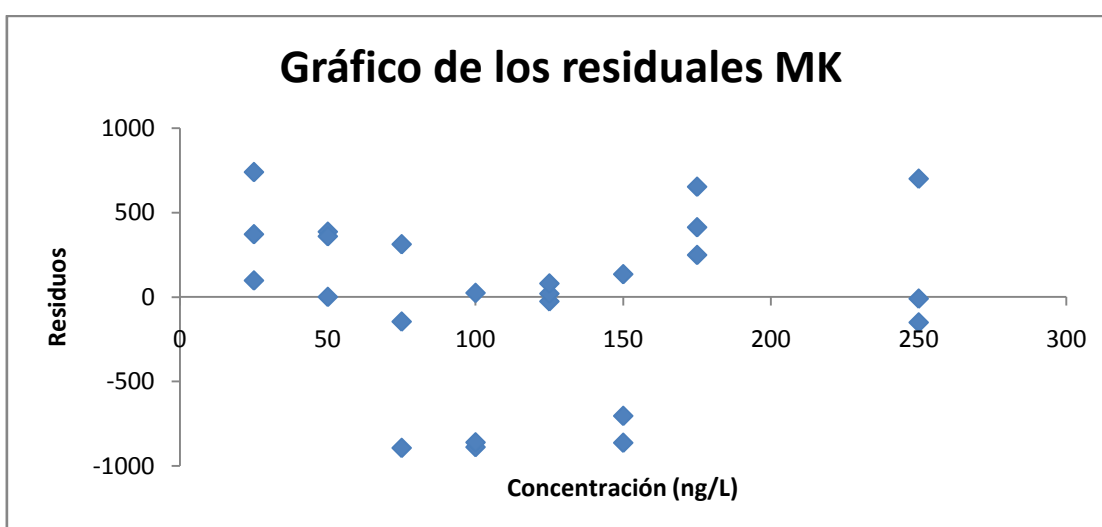


Figura IV.15. Representación del gráfico de los residuales del MK

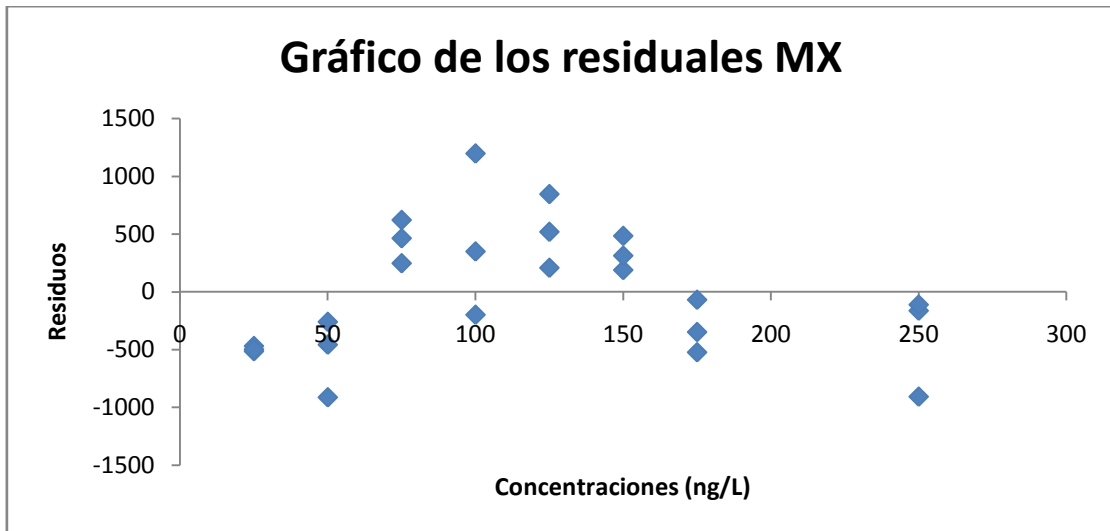


Figura IV.16. Representación del gráfico de los residuales del MX

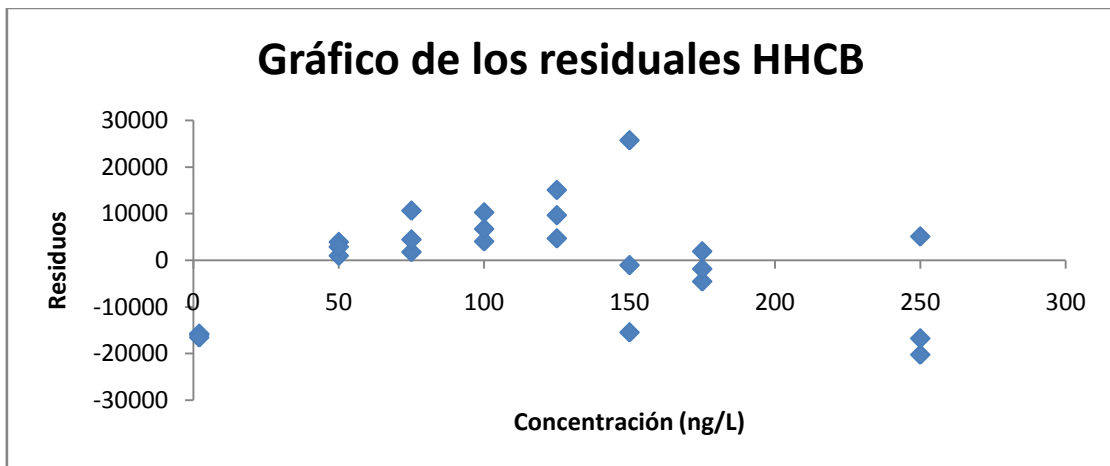


Figura IV.17. Representación del gráfico de los residuales del HHCB

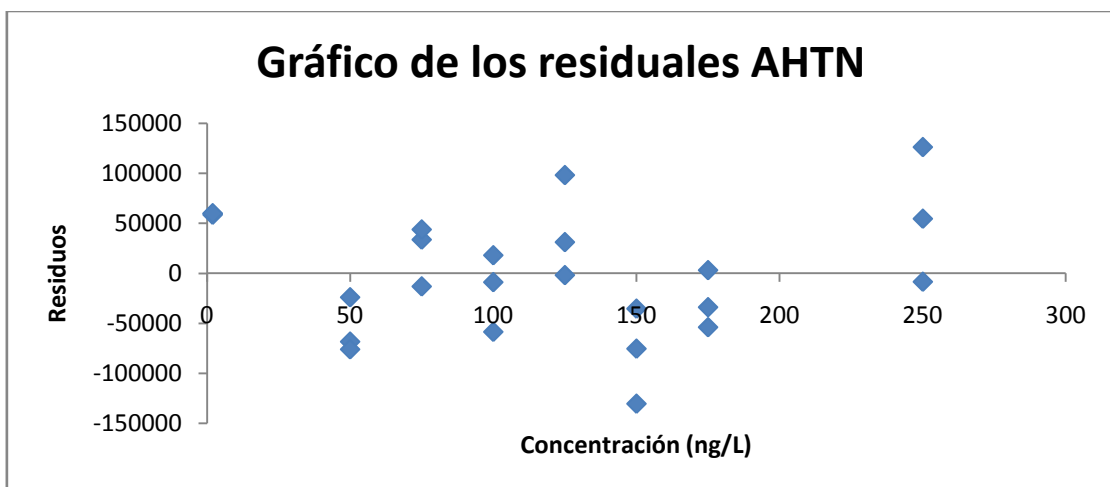


Figura IV.18. Representación del gráfico de los residuales del AHTN

Se observa en las graficas de residuales, que los valores oscilan alrededor del cero en positivo y negativo, de manera uniforme. Se podría concluir que los gráficos de las residuales presentan un comportamiento de homocedasticidad en todos los niveles.

D. Análisis de varianza de los residuales. Aunque los resultados obtenidos con los criterios anteriores han sido correctos, en términos estadísticos no son del todo fidedignos, debido a que al estudiarlos se asumen que el residual de la media siempre es cero y esto es solo una suposición). Por ello, se ha realizado también un análisis estadístico de los residuales mediante el análisis normalizado de la varianza (ANOVA).

Este valor experimental de F se calcula dividiendo el cuadrado de $S_{y/x}$ entre el cuadrado de S_y . Este último se obtiene del promedio de la varianzas obtenidas en cada punto de calibración

El valor de F experimental se compara con el valor tabulado de para un nivel de confianza determinado (95 %, por ejemplo). Si $F_{exp} < F_{tabulado}$ (95% de probabilidad; grados de libertad menos 2; n° niveles de calibración), se puede confirmar que la correlación es lineal. El valor de $F(0.05;22;8)$ seria 3,131 igual en todos los casos y los valores experimentales se indican en la tabla IV.6.

Tabla IV.6. Calculo de F experimental para el análisis de la varianza

Análisis de Varianza	MA	MK	MX	HHCB	AHTN
$(S_{y/x})^2$	887833	266373	306421	140289646	3918022296
$(S_y)^2$	663077	166263	126816	86790378	1868986225
F_{exp}	1,34	1,60	2,42	1,62	2,10

Se puede comprobar que todos los datos de F_{exp} son inferiores a 3,131, que es el $F_{tabulado}$, con lo cual se confirma que la distribución es lineal en todos los casos.

E. Factores de respuesta / Sensibilidad. Finalmente, se decide comprobar la linealidad teniendo en cuenta los valores de sensibilidad (factores de

respuesta), los cuales deben estar entre los límites de tolerancia de $\pm 20\%$ sobre la ecuación de la recta calculada. Para ellos se debe analizar una recta de calibrado en la cual cada punto se encuentre por triplicado y con un mínimo de cinco puntos de calibración. Los valores de sensibilidad se calculan en cada punto el valor de Y/X , se calcula la media de todos los valores, desde la cual se calcula un $\pm 20\%$, obteniéndose así el rango en el cual se deben de encontrar todos los puntos de la recta de calibrado. Se representa gráficamente todos los datos para cada almizcle en las figuras IV.19 a IV.23.

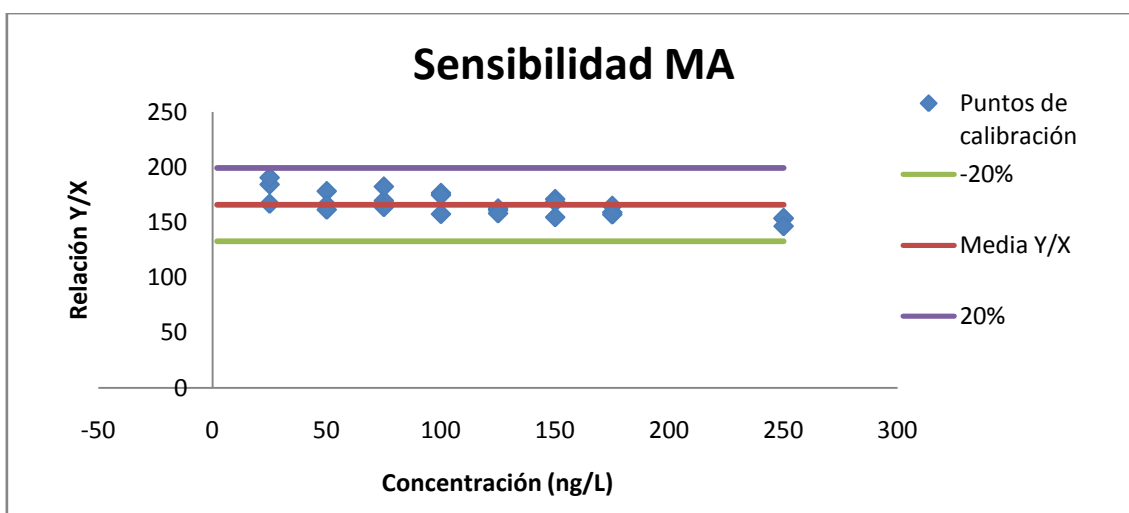


Figura IV.19. Grafica de sensibilidad para MA

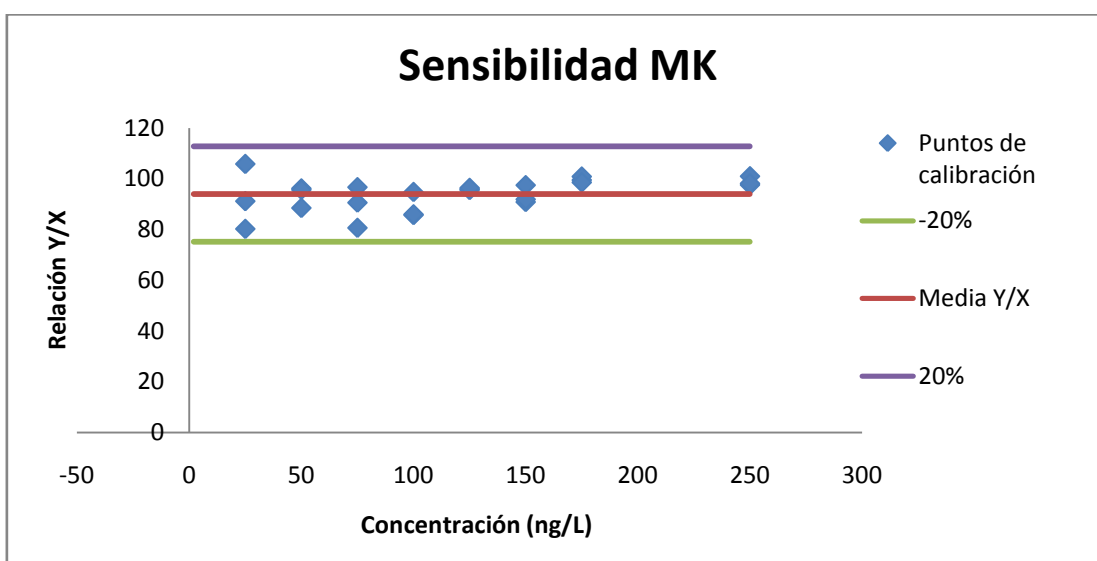


Figura IV.20. Grafica de sensibilidad para MK

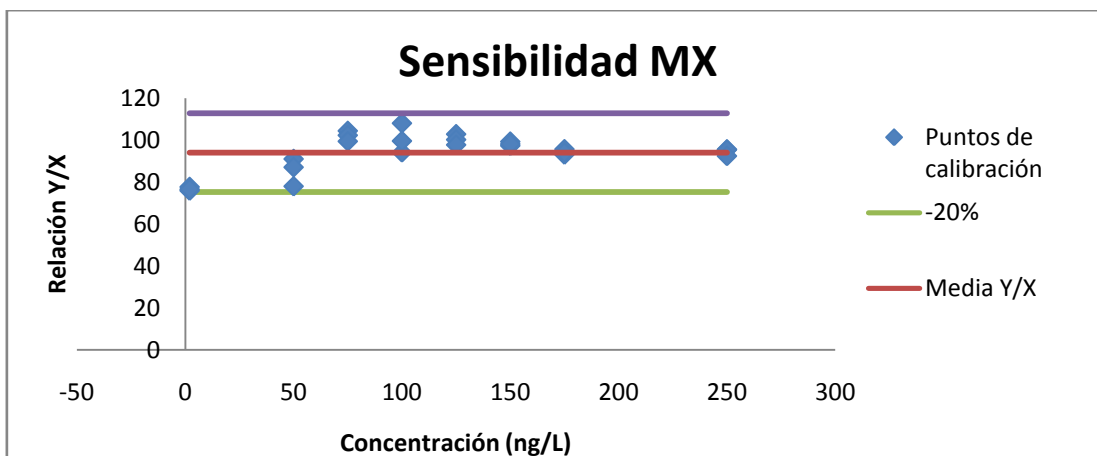


Figura IV.21. Grafica de sensibilidad para MX

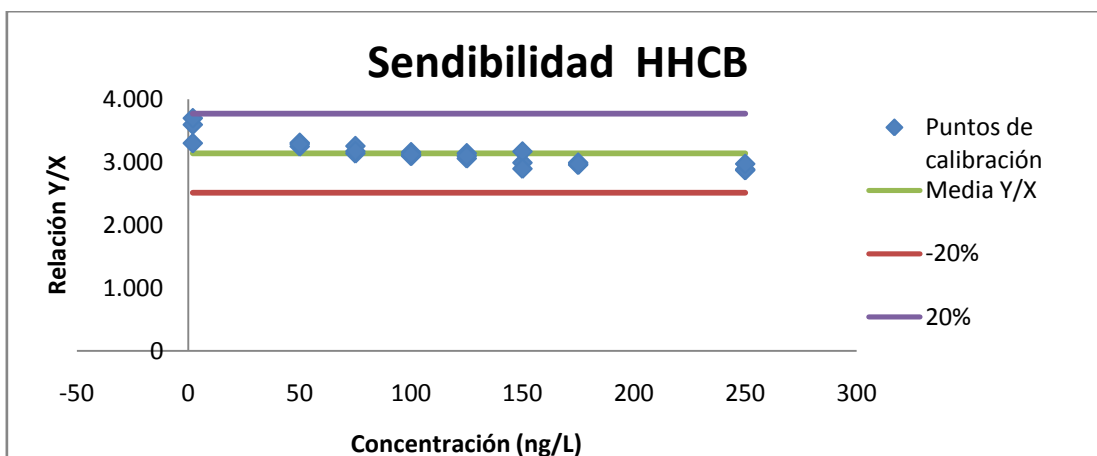


Figura IV.22. Grafica de sensibilidad para HHCB

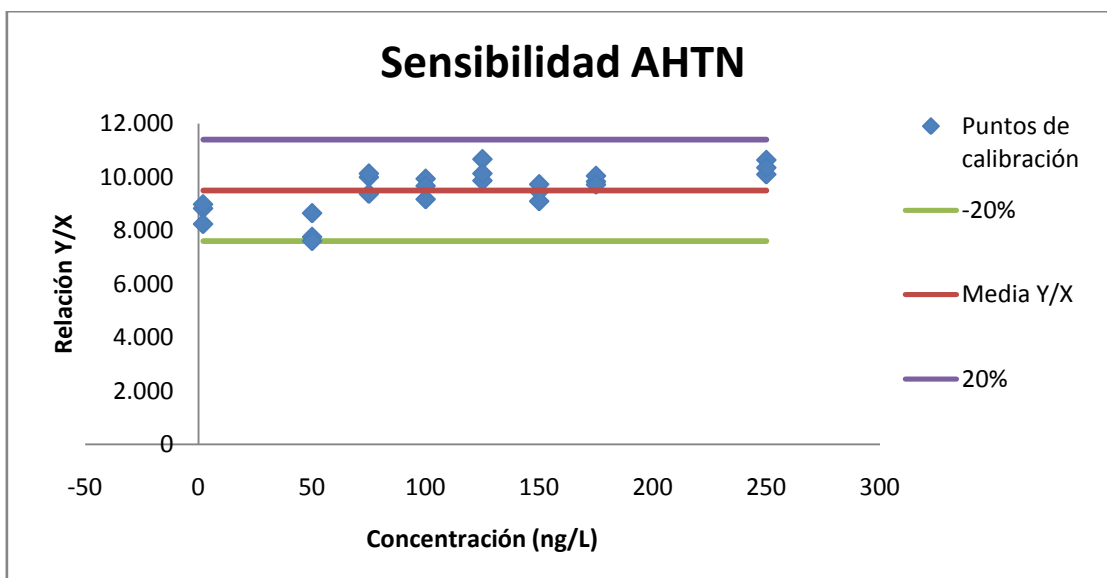


Figura IV.23. Grafica de sensibilidad para AHTN

Se observa que todos los puntos de calibración se encuentran dentro de los límites de tolerancia establecidos para la sensibilidad, con lo cual se puede concluir que las rectas de calibrado siguen un modelo lineal, como se ha confirmado en todas las comprobaciones realizadas.

A modo de resumen de este apartado de linealidad, en la tabla IV.7. aparecen los parámetros estadísticos obtenidos para los distintos métodos utilizados para evaluar la linealidad del método.

Tabla IV.7. Resumen de los parámetros estadísticos de los métodos utilizados para validar la linealidad.

Almizcles	Recta	b	a	S _b	S _a	r	% lin	S _{y/x}	F _{exp}	Sensibilidad Y/X
MA	1	150,5	1614,4	4,59	62,82	0,997	96,95	884,63	1,34	166 ± 20 %
	2	153,3	1363,4	5,06	69,24	0,997	96,70	975,12		
	3	144,4	1353,5	2,91	39,81	0,999	97,99	560,59		
	suma	149,4	1443,8	2,82	38,63	0,996	98,11	942,25		
MK	1	101,6	-600,0	2,58	35,36	0,998	97,46	497,98	1,60	94 ± 20 %
	2	99,4	-578,9	3,71	50,76	0,996	96,27	714,84		
	3	100,7	-647,5	2,10	28,73	0,999	97,92	404,59		
	suma	100,6	-608,8	1,55	21,16	0,997	98,46	516,11		
MX	1	96,4	241,1	3,38	46,29	0,996	96,49	651,89	2,42	94 ± 20 %
	2	96,7	-139,4	2,33	31,93	0,998	97,59	449,73		
	3	95,1	-69,4	3,00	4,11	0,997	96,84	578,90		
	suma	96,0	10,8	1,66	2,27	0,997	98,27	553,55		
HHCB	1	2855,2	20073,1	62,47	853,62	0,999	97,81	12796,66	1,62	3142 ± 20 %
	2	2874,5	19505,2	73,17	999,78	0,998	97,45	14987,84		
	3	2919,9	12486,4	50,72	693,10	0,999	98,26	10390,32		
	suma	2883,2	17354,9	33,38	456,16	0,999	98,84	11844,39		
AHTN	1	10395,7	-52793,5	338,41	4624,27	0,997	96,74	69322,76	2,10	9496 ± 20 %
	2	10598,9	-67840,2	266,73	3644,72	0,998	97,48	54638,26		
	3	10349,8	-94936,7	346,91	4740,36	0,997	96,65	71063,14		
	suma	10380,8	-62804,8	176,42	2410,68	0,997	98,30	62594,11		

3.3. Exactitud

La definición de exactitud, según la UNE-ISO Guía 99 IN (2012), vocabulario internacional de metrología es "Proximidad entre un valor medido y un valor verdadero de un mensurando". El concepto de exactitud no representa una magnitud y no se expresa numéricamente. Se dice que una medida es más exacta cuanto más pequeño es el error de medida. La exactitud incluye los conceptos de veracidad y precisión.

$$e_i = x_i - \mu = (x_i - \bar{x}_i) + (\bar{x}_i - \mu)$$

El error, e_i , es por tanto la diferencia entre el valor obtenido x_i , y el valor verdadero μ , $e_i = x_i - \mu$. Este error es lo que la ISO llama exactitud según se dijo anteriormente. En el caso de disponer de varias medidas la concentración de analito se estima mediante la media de las medidas, \bar{x}_i pudiendo dividir la ecuación en dos términos. El primer sumando es la componente del error aleatorio y el segundo corresponde con el error sistemático. Dado que el error sistemático produce un sesgo en el resultado y los errores aleatorios causan imprecisión, la exactitud hace referencia a una combinación de veracidad y precisión.

3.3.1. Veracidad

La veracidad se define como: "Proximidad entre la media de un número infinito de valores medidos repetidos y un valor de referencia".

Para evaluar este parámetro existen diferentes opciones:

- Los Materiales de referencias certificados, (MRCs o CRMs por su siglas en inglés), van acompañado de un certificado, en el cual uno o más valores de sus propiedades, están certificados por un procedimiento que establece su trazabilidad con una realización exacta de la unidad en la que se

expresan los valores de la propiedad y para la cual cada valor certificado se acompaña de una incertidumbre con la indicación de un nivel de confianza (definido por CEM: Centro Español de metrología). Estos controles o patrones se utilizan para comprobar la trazabilidad de los productos de metrología, para validar los métodos de medición analíticos, o para la calibración de los instrumentos. Los materiales de referencias deben ser lo más parecidos posibles a la matriz objeto de estudio. En este trabajo no se ha encontrado ningún material de referencia certificado para los compuestos objeto de estudio, en ninguna matriz, esto es lógico al ser contaminantes emergentes.

- Comparación de los resultados con un método de referencia. La verificación de la trazabilidad en este caso se realiza analizando numerosas muestras reales que cubran el intervalo establecido de concentraciones del analito con el método de referencia y el candidato. El método de referencia suele ser un método normalizado o un método oficial de análisis (validada por alguna organización de reconocido prestigio). Esta comparación será válida siempre y cuando el método de referencia se aplique en condiciones de aseguramiento de la calidad. El caso más usual es que las muestras representativas se analicen en un solo laboratorio. Sin embargo, también pueden ser analizadas por varios laboratorios consiguiendo, de esta forma, una mayor trazabilidad. Tampoco en este trabajo se puede comparar con un método de referencia, debido a que no existe.

- Ensayos de recuperación. La IUPAC define la recuperación como “la proporción de la cantidad de analito, presente o añadida a una muestra, que se extrae y se presenta para su medida”. Este parámetro se debe evaluar en las diferentes matrices en las cuales el método sea aplicable. Se realizará añadiendo una cantidad conocida del analito a la matriz a evaluar. Esta adicción debe hacerse preferentemente en tres niveles de concentración (a los niveles bajo, medio y alto del rango de trabajo del método). Las recuperaciones se deberían evaluar en todas las etapas del proceso que pudieran afectar al analito, es decir, extracción, purificación, concentración, desorción, etc. En este caso, se produce así, debido a que el procedimiento se encuentra automatizado, tanto la incubación, extracción de la muestra por parte

de la fibra, desorción en el inyector, separación cromatográfica, hasta la llegada al detector.

El estudio de recuperación se realizó en las diferentes matrices, que en este caso serían: agua de río, agua de mar y aguas residuales urbanas. Se realizaron dopando en tres niveles de concentración como son 50 ppt, 100 ppt y 150 ppt, siempre por triplicado en cada nivel y matriz.

Los valores de recuperación se calcularon con la siguiente expresión:

$$R(\%) = \frac{A_{\text{dopada}} - A_{\text{blanco}}}{A_{\text{patrón}}}$$

Donde R representa la recuperación expresada en porcentaje. A_{dopada} , es el área medida en la muestra dopada; A_{blanco} , es el área de aquellos principios activos presentes en el blanco de muestra (es decir, la muestra sin dopar) y $A_{\text{patrón}}$, es el área del patrón que muestra la misma concentración que la esperada tras el tratamiento de la muestra para un valor de recuperación del 100 %. Los resultados obtenidos de recuperación y la RSD de las medidas se presentan en la tabla IV.8.

Tabla IV.8. Recuperaciones en las diferentes matrices y rangos de concentración estudiados.

Matrices	Rango de concentración	Recuperación									
		MA		MC		MX		HHCB		AHTN	
		R (ppt)	RSD (%)	R (ppt)	RSD (%)	R (ppt)	RSD (%)	R (ppt)	RSD (%)	R (ppt)	RSD (%)
Agua de río	Alto	98,9	6,76	89,1	6,75	100	6,36	95,5	6,28	104	3,37
	Medio	97,4	6,11	88,5	7,83	94,2	4,99	104	7,39	92,1	8,83

Matrices	Rango de concentración	Recuperación									
		MA		MC		MX		HHCB		AHTN	
		R (ppt)	RSD (%)	R (ppt)	RSD (%)	R (ppt)	RSD (%)	R (ppt)	RSD (%)	R (ppt)	RSD (%)
	Bajo	110	7,05	95,6	3,49	94,4	2,15	99,4	5,29	99,3	7,43
Agua de mar	Alto	108	5,94	106	2,53	96,9	6,01	96,2	4,44	92,0	2,80
	Medio	84,9	1,68	90,1	6,15	100	6,09	87,5	2,07	100	6,11
	Bajo	89,2	8,76	89,9	6,19	94,9	3,63	95,0	5,68	89,1	4,69
Agua residual	Alto	84,9	3,77	89,3	3,29	95,8	1,90	98,2	1,09	102	2,97
	Medio	85,4	5,31	85,0	3,48	87,7	8,49	110	1,98	93,1	4,20
	Bajo	111	4,35	96,1	6,91	84,9	6,24	97,1	1,65	88,8	9,00

Se observa que las recuperaciones oscilan entre un 88,5 % y el 110%, para las aguas procedentes de río; para el agua de mar este rango está entre 84,9 y 108; y para las aguas residuales varía su porcentaje de recuperación entre 84,9 y 111. Este último rango englobaría a las tres matrices estudiadas. La desviación estándar relativa máxima es de 9%, valor obtenido en el dopaje del rango bajo para las aguas residuales urbanas. Se considera que estas recuperaciones están dentro de rangos establecidos por la guía SANTE, la cual indica que las recuperaciones deben encontrarse en un rango entre el 70 y 120%, con lo cual las recuperaciones son buenas, lo que significaría, que no se ven los resultados condicionados por un efecto matriz.

Estos datos también se pueden evaluar según los criterios de la AOAC (Asociación Oficial de Químicos Analíticos), para ensayos de recuperación, que se resumen en la siguiente tabla IV.9.

Tabla IV.9. Criterios de recuperación de AOAC

Concentración del analito	Intervalo de recuperación (%)
≥ 10%	98-102
≥ 1%	97-103
≥ 0,1%	95-105
≥ 100 ppm	90-107
≥ 0,1-10 ppm	80-110

Concentración del analito	Intervalo de recuperación (%)
≥ 10 ppb	65-115
≥ 1 ppb	40-120

Teniendo en cuenta los criterios de AOAC, y que las concentraciones estudiadas en este trabajo son de ppt (ng/L), se tendría que cumplir el criterio de aceptación más amplio que sería de 40-120%, el cual es menos restrictivo que el de la guía SANTE. Con lo cual los porcentajes de recuperaciones para este método en matrices de agua de río, agua de mar y aguas residuales, son correctos y puede considerarse validado este parámetro de veracidad.

Dado que los estudios de veracidad han demostrado que no existe efecto matriz, lo cual era de esperar dadas las características del método al no introducirse la fibra en la muestra, los siguientes ensayos se harán directamente con los patrones en medio acuoso.

3.3.2. Precisión

Según la Guía Eurachem, la “precisión” es una medida del grado de cercanía de los resultados unos con respecto a los otros y por lo general se expresa mediante parámetros tales como la desviación estándar, la cual describe la dispersión de los resultados.

Normalmente, la “precisión” se determina para circunstancias específicas las cuales en la práctica pueden ser muy variadas. Las medidas de precisión más comunes son la “repetitividad” y la “reproducibilidad”. Éstas representan las dos medidas extremas de precisión que pueden obtenerse. La repetitividad (la precisión más pequeña esperada) dará una idea de la clase de variabilidad esperada cuando un método se ejecuta por un solo analista, con un equipo en un período corto de tiempo, es decir, es la clase de variabilidad que se espera entre resultados cuando una muestra se analiza en las mismas circunstancias. Si la muestra se analiza por varios laboratorios para fines comparativos, entonces una medida de precisión más significativa a usarse es la reproducibilidad (ésta es la medida de precisión más grande normalmente

encontrada). Puede ser que para algunos casos particulares sea más útil una medida intermedia de la precisión, por ejemplo la precisión medida entre diferentes analistas, en períodos de tiempo prolongados, dentro de un solo laboratorio. Esto algunas veces se conoce como “precisión intermedia”, pero las condiciones exactas deberán ser especificadas. La precisión se determina por lo general en términos de desviación estándar o desviación estándar relativa. Tanto la reproducibilidad como la repetitividad dependen generalmente de la concentración del analito y deben determinarse a varias concentraciones y de ser pertinente, deberá establecerse la relación entre la precisión y la concentración del analito. La desviación estándar relativa puede ser más útil en este caso puesto que es la desviación estándar (S) dividida por la concentración (\bar{X}) y multiplicada por 100.

$$\%RSD = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$$

En este trabajo se evaluaron, la repetitividad y la reproducibilidad que se equiparó a la precisión intermedia, siendo imposible participar en un ensayo de intercomparación, para calcular la reproducibilidad del análisis inter-laboratorios para los compuestos estudiados.

3.3.2.1. Repetitividad

La repetitividad de la medida cromatográfica fue evaluada mediante la repetición 10 veces (n=10) de disoluciones patrón mezcla de las fragancias estudiadas a tres niveles de concentración: 25, 100 y 250 ng/L. Se realizó el cálculo de la media aritmética, desviación estándar, desviación estándar relativa y nivel de confianza. Los resultados se pueden ver en las tablas IV.10, IV.11 y IV.12.

El cálculo del límite de confianza de una media viene dado por la expresión:

$$\bar{x} \pm zs/\sqrt{n}$$

Donde en ausencia de errores sistemáticos, el valor nominal (μ) debe estar dentro del intervalo de confianza.

$$\bar{x} - zs/\sqrt{n} < \mu < \bar{x} + zs/\sqrt{n}$$

La amplitud de este intervalo depende de dos factores:

- La precisión de los valores individuales, que dependen de la desviación estándar de la población (s).
- El número de medidas de la muestra (n), pues el hecho de repetir las medidas implica tener más confianza en el resultado.

Donde $z=1,96$ para un 95% de nivel de confianza, 2,58 para el 99% y 2,97 para el 99.7%. Se ha elegido Z para un 99,7% de nivel de confianza.

Tabla IV.10. Resultados de repetitividad del patrón de 25 ng/L.

Repetitividad	Patrón de 25 ng/L				
Fragancias	MA	MK	MX	HHCB	AHTN
Valores obtenidos	24,05	22,70	23,82	24,70	27,61
	25,43	25,75	23,72	26,08	27,74
	23,41	26,73	27,28	25,78	24,93
	22,10	28,50	27,89	25,62	25,57
	25,57	22,76	26,22	25,41	23,03
	24,75	24,46	28,40	23,45	25,75
	26,17	24,18	23,54	25,18	28,09
	24,26	24,98	27,10	25,52	23,40
	24,19	25,25	24,64	26,13	27,97
	24,61	24,87	22,97	26,13	26,73
Media	24,45	25,02	25,56	25,40	26,08
SD	1,16	1,74	2,04	0,82	1,86
Limites de confianza	24,45 ± 1,09	25,02 ± 1,62	25,56 ± 1,91	25,40 ± 0,77	26,08 ± 1,75
RSD (%)	4,75	6,95	7,97	3,23	7,15

Tabla IV.11. Resultados de repetitividad del patrón de 100 ng/L.

Repetitividad	Patrón de 100 ng/L				
Fragancias	MA	MK	MX	HHCB	AHTN
Valores obtenidos	102,70	98,57	99,20	102,00	101,50
	100,30	98,76	99,51	103,41	99,68
	104,70	99,27	97,48	99,22	99,67
	102,10	100,52	98,19	99,06	96,68
	102,30	100,40	98,88	98,74	98,94
	101,60	97,18	99,09	99,71	96,93
	104,10	98,22	99,09	98,59	99,63
	101,70	100,80	99,94	101,62	101,44
	103,50	98,83	98,05	98,24	104,18
	101,20	104,60	102,60	99,42	99,06
Media	102,42	99,72	99,20	100,00	99,77
SD	1,36	2,06	1,40	1,73	2,21
Limites de confianza	102,42 ± 1,27	99,72 ± 1,93	99,20 ± 1,31	100,00 ± 1,62	99,77 ± 2,08
RSD (%)	1,32	2,06	1,41	1,73	2,22

Tabla IV.12. Resultados de repetitividad del patrón de 250 ng/L.

Repetitividad	Patrón de 250 ng/L				
Fragancias	MA	MK	MX	HHCB	AHTN
Valores obtenidos	261,97	252,11	246,67	255,34	260,27
	252,28	243,61	260,27	250,92	252,62
	247,52	241,74	251,09	260,10	252,79
	261,97	243,27	255,85	251,26	265,88
	260,10	262,99	248,20	253,81	250,58
	263,16	254,15	253,64	263,67	255,68
	250,24	253,64	255,00	267,07	252,96
	255,17	258,23	249,73	261,29	271,15
	256,36	257,55	252,79	246,67	242,76
	263,84	249,05	264,52	261,46	263,84
	252,45	271,15	254,15	264,62	255,34
Media	256,82	253,41	253,81	257,16	256,72
DS	5,74	9,44	4,87	6,89	8,32
Limites de confianza	256,82 ± 5,14	253,41 ± 8,45	253,81 ± 4,36	257,16 ± 6,17	256,72 ± 7,45
RSD (%)	2,24	3,72	1,92	2,68	3,24

Se observa que el valor nominal no está dentro para algunos compuestos como sería para el patrón de 250 ng/L para los compuestos MA y HHCB, esto tiene que venir provocado por una desviación en el enrase de la concentración teórica preparada, debido que todos los valores medios están

más cerca de 255 ng/L, que del teórico. Lo mismo se aprecia en el caso de MA en el patrón de 100 ng/L.

Los valores de repetitividad obtenida en la medida cromatográfica, expresadas como % de RSD de las concentraciones medidas, variaron entre 1,32 % correspondiente a almizcle ambreta y 7,97 % correspondiente a almizcle xileno. Según los criterios de aceptación de la guía SANTE, el porcentaje de desviación estándar relativa debe ser $\leq 20\%$, tanto para la repetitividad como para la reproducibilidad dentro del laboratorio. Los resultados serían aceptables al encontrarse por debajo del 20% para RSD.

También se puede valorar los parámetros con los criterios de AOAC y Horwitz, que se resumen en la tabla IV.13.

Donde la tolerancia correspondiente a la precisión se puede usar el criterio conocido como Trompeta de Horwitz, el cual dedujo una expresión para predecir el valor esperado para la desviación estándar relativa para la precisión intermedia (o interlaboratorio) a partir de la concentración de analito, c (en tanto por 1).

$$RSD_H = 2^{(1-0,5\log c)}$$

El valor de RSD_R obtenido se compara con el predicho por Horwitz (RSD_H) mediante el parámetro Horrat.

$$Horrat = \frac{RSD_R}{RSD_H}$$

Si el valor del parámetro Horrat es igual o menor a 2 se puede decir que el método tiene valores aceptables de precisión intermedia.

Además de comparar con los valores de Horwitz, se puede también comparar con los valores establecidos por la AOAC. Estos valores y los obtenidos por Horwitz se presentan en la siguiente tabla IV.13.

Tabla IV.13. Valores de tolerancia de Horwitz y AOAC.

Concentración de analito	Horwitz %RSD	AOAC %RSD
≥ 10%	2,8	1,8
≥ 1%	4	2,7
≥ 0,1%	5,7	3,7
≥ 100 ppm	8	5,3
10 ppm	11,3	7,3
1 ppm	16	11
100 ppb	22,6	15
10 ppb	32	21
1 ppb	45,3	30

Los criterios de tolerancia de Horwitz y la AOAC, son menos restrictivos que los que se han seleccionado de la guía SANTE, con lo cual, como los valores obtenidos de RSD para repetitividad cumplían los criterios de esta última, también se cumplen los criterios de Horwitz y AOAC.

3.3.2.2. Reproducibilidad / Precisión intermedia

La precisión intermedia de la medida cromatográfica fue evaluada mediante la medida en 7 días consecutivos de disoluciones patrón mezcla de las fragancias estudiadas a tres niveles de concentración: 25, 100 y 250 ppt. Los resultados obtenidos se presentan en las tablas IV.14 hasta la IV.18., donde se indican los días de medida los resultados obtenidos para cada concentración, valor medio, desviación estándar, RSD y límites de confianza.

Tabla IV.14. Resultados de precisión intermedia del almizcle ambreta.

Nº días	Precisión intermedia MA		
	25 ng/L	100 ng/L	250 ng/L
1	28,93	97,73	264,10
2	29,05	117,35	247,77

Precisión intermedia MA			
Nº días	25 ng/L	100 ng/L	250 ng/L
3	27,88	100,99	243,56
4	24,96	99,15	247,77
5	22,23	96,18	235,57
6	20,57	89,40	228,86
7	23,41	88,78	197,75
Media	25,29	98,51	237,91
SD	3,40	9,53	20,87
RSD (%)	13,45	9,68	8,77
Limites de confianza	25,29 ± 3,82	98,51 ± 10,70	237,91 ± 23,43

Tabla IV.15. Resultados de precisión intermedia del almizcle cetona.

Precisión intermedia MK			
Nº días	25 ng/L	100 ng/L	250 ng/L
1	23,98	107,15	259,90
2	20,74	96,59	258,44
3	22,46	100,53	201,32
4	22,41	96,26	230,78
5	20,83	86,44	210,97
6	20,54	84,54	221,95
7	22,63	83,88	190,50
Media	21,94	93,63	224,84
SD	1,28	8,90	26,85
RSD (%)	5,81	9,51	11,94
Limites de confianza	21,94 ± 1,43	93,63 ± 9,99	224,84 ± 30,15

Tabla IV.16. Resultados de precisión intermedia del almizcle xileno.

Precisión intermedia MX			
Nº días	25 ng/L	100 ng/L	250 ng/L
1	23,08	101,02	257,88
2	24,39	107,96	215,64
3	20,29	102,77	240,67
4	23,09	93,24	223,67
5	19,03	88,48	186,28
6	24,84	87,56	190,43
7	25,06	81,22	192,32
Media	22,82	94,61	215,27
SD	2,33	9,61	27,44
RSD (%)	10,19	10,16	12,74
Limites de confianza	22,82 ± 2,61	94,61 ± 10,79	215,27 ± 30,45

Tabla IV.17. Resultados de precisión intermedia para Galaxolide.

Precisión intermedia HHCB			
Nº días	25 ng/L	100 ng/L	250 ng/L
1	25,74	122,85	265,46
2	27,39	113,46	221,57
3	22,09	93,02	248,26
4	28,83	98,26	255,05
5	29,34	100,51	208,33
6	26,24	94,65	240,69
7	28,05	93,86	185,62
Media	26,81	102,37	232,14
SD	2,45	11,42	28,32
RSD (%)	9,15	11,15	12,20
Limites de confianza	26,81 ± 2,75	102,37 ± 12,87	232,14 ± 31,79

Tabla IV.18. Resultados de precisión intermedia para Tonalide

Precisión intermedia AHTN			
Nº días	25 ng/L	100 ng/L	250 ng/L
1	23,20	136,00	217,30
2	27,63	117,21	258,53
3	24,82	99,15	262,15
4	28,75	104,50	293,11
5	23,05	101,74	239,55
6	23,35	102,07	207,09
7	24,11	97,16	212,68
Media	24,99	108,26	241,49
SD	2,29	13,85	31,58
RSD (%)	9,18	12,79	13,08
Limites de confianza	24,99 ± 2,57	108,26 ± 15,55	241,49 ± 35,45

Se observa a partir de los resultados de las tablas anteriores que los valores de reproducibilidad obtenidos expresados como % de RSD de las concentraciones medidas, variaron entre 5.81% correspondiente a almizcle cetona y 13,45 % correspondiente a almizcle ambreta. Los valores de RSD varían en función de rango en: 5,81 % a 13,45 % para el más bajo, para el intermedio los valores oscilan entre 9,51 % y 12,79 %, mientras que el rango más alto se encuentra entre 8,71% a 13,08 % . El valor nominal se encuentra dentro del rango de confianza en todos los rangos excepto en valor de MK para 25 ng/L, donde la concentración media obtenida es inferior y para el MX en el

rango más alto, puede ser debido por la caída de la concentración del patrón de 250 ng/L.

Teniendo en consideración que en estas pruebas de repetitividad y precisión intermedia no se tiene en cuenta solo el proceso cromatográfico, sino también la extracción de la muestras, se considera que los resultados tienen una precisión intermedia aceptable. Los criterios de validación para la reproducibilidad intermedia son los mismo que los de repetitividad, según la guía SANTE ($RSD \leq 20\%$). Según los criterios de Horwitz ($RSD \leq 45.3\%$) y de la AOAC ($RSD \leq .30\%$) que se indican en la tabla IV.10 (se toman esos valores porque son los que pertenecen a la concentración más baja, aunque en este trabajo las concentraciones que se están evaluando son inferiores de ng/L.).

Los valores obtenidos en el presente trabajo tienen como valor máximo 13,45%, el cual cumple los valores de la guía SANTE, los recomendado por la AOAC, para el análisis de componentes ultra trazas y por supuesto los de Horwitz.

Finalmente, se quiere resaltar un efecto en los datos de patrón de 250 ng/L, en condiciones de reproducibilidad intermedia, donde se observa un descenso de su concentración a lo largo de la semana, esto es debido al agotamiento de la fibra, según el fabricante, una fibra se puede usar para 50 pinchazos en condiciones optimas, si eso fuera así, el coste de la fibra sería difícil de amortizar. En el ensayo el equipo ha estado midiendo 24 horas durante una semana, eso serian unas 24 muestras al días, es decir, unas 168 muestras a la semana y su deterioro se nota en el punto más alto de la recta en los últimos días. Si se procede al acondicionamiento de la fibra, se recuperan condiciones iniciales, que no se llevo a cabo en este ensayo para que se notara el efecto de degradación o agotamiento de la fibra.

3.4. Límites de detección y cuantificación

Se define el límite de detección como la concentración de analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco más tres veces la desviación estándar del blanco (según la IUPAC 1987).

La definición del límite de cuantificación correspondería a la concentración de analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco más diez veces la desviación estándar del blanco (según la IUPAC 1997).

Los límites de detección y cuantificación para cada una de las fragancias se estimaron a través de la relación señal/ruido (S/R), empleando la relación entre la intensidad del pico correspondiente y la intensidad del ruido. El límite de detección se estableció como aquella concentración que origina en el instrumento una señal igual a tres veces la relación S/R; y el límite de cuantificación, como aquella concentración que origina en el instrumento una señal igual a diez veces la relación S/R:

$$y_{LOD} = 3 \cdot \frac{S}{R}$$

$$y_{LOQ} = 10 \cdot \frac{S}{R}$$

Donde LOD, representa la señal que originaría una concentración de analito igual al límite de detección; LOC, representa la señal que originaría una concentración de analito igual al límite de cuantificación; S es la intensidad de pico y R es el ruido del instrumento en la zona correspondiente al pico cromatográfico del analito evaluado.

El cálculo del LOD y LOC, se realizó midiendo ocho veces el patrón más bajo de la recta de calibrado para cada fragancia seleccionada, estimado en su rango lineal, tomando la media de la S/N de cada uno de esos patrones y realizando el cálculo arriba indicado.

En la tabla IV.19 se indican los valores de S/N obtenidos para cada uno de los compuestos y el cálculo del LOD, LOC, SD y límite de confianza. En la tabla IV.20. los valores resultantes para este método.

Tabla IV.19. Datos de la señal ruido obtenida para cada almizcle.

Muestras	MA			MK			MK		
	S/R	LOD	LOC	S/R	LOD	LOC	S/R	LOD	LOC
1	13	5,77	19,23	34	2,21	7,35	46	1,63	5,43
2	16	4,69	15,63	39	1,92	6,41	69	1,09	3,62
3	16	4,69	15,63	36	2,08	6,94	80	0,94	3,13
4	15	5,00	16,67	30	2,50	8,33	64	1,17	3,91
5	16	4,69	15,63	29	2,59	8,62	69	1,09	3,62
6	20	3,75	12,50	41	1,83	6,10	83	0,90	3,01
7	17	4,41	14,71	33	2,27	7,58	61	1,23	4,10
8	17	4,41	14,71	36	2,08	6,94	69	1,09	3,62
Media		4,68	15,59		2,19	7,28		1,14	3,81
SD		0,57	1,91		0,26	0,88		0,23	0,75
Nivel de confianza (99 %)		0,52	1,74		0,24	0,80		0,21	0,68
Muestras	Galaxolide			Tonalide					
	S/R	LOD	LOC	S/R	LOD	LOC			
1	206	0,03	0,10	143	0,04	0,14			
2	226	0,03	0,09	160	0,04	0,13			
3	213	0,03	0,09	141	0,04	0,14			
4	184	0,03	0,11	123	0,05	0,16			
5	276	0,02	0,07	161	0,04	0,12			
6	303	0,02	0,07	187	0,03	0,11			
7	257	0,02	0,08	158	0,04	0,13			
8	262	0,02	0,08	210	0,03	0,10			
Media		0,026	0,085		0,038	0,128			
SD		0,004	0,014		0,006	0,021			
Nivel de confianza (99 %)		0,004	0,013		0,006	0,019			

Tabla IV.20. Valores de LOD y LOC, con el intervalo de confianza.

Fragancias	LOD (ppt)	LOC (ppt)
A. Ambreta	4,68 ± 0,52	15,59 ± 1,74
A. Cetona	2,19 ± 0,24	7,28 ± 0,80
A. Xileno	1,14 ± 0,21	3,81 ± 0,68
Galaxolide	0,026 ± 0,004	0,085 ± 0,013
Tonalide	0,038 ± 0,004	0,128 ± 0,019

Los límites de detección y cuantificación son adecuados, e inferiores a los de otros estudios como se puede comprobar en la tabla I.7. Las concentraciones en las muestras para galaxolide y tonalide, están en concentraciones altas, no llegando a necesitar el uso de los LOD y LOC. El resto de los almizcles en ocasiones no son detectados.

3.5. Robustez

La robustez se define como la capacidad de un procedimiento analítico para permanecer inalterado por variaciones pequeñas pero deliberadas de los parámetros característicos del método. La robustez suministra información sobre la fiabilidad del procedimiento analítico con respecto al control de las variables que definen las condiciones operativas (experimentales e instrumentales) durante su utilización normal de rutina. Generalmente dicha evaluación se basa en introducir deliberadamente pequeños cambios en el valor nominal de las condiciones de operación y examinar el efecto de dichos cambios sobre los resultados. Para ello, se puede aplicar la metodología de diseño estadístico de experimentos utilizando el diseño factoriales a dos niveles.

En este trabajo de investigación se ha aplicado el procedimiento de Youden, para evaluar la robustez del método desarrollado, el cual permite evaluar siete variables con el análisis de sólo ocho muestras. Las variables deben ser elegidas estratégicamente. Se examina el método y se identifican aquellas etapas que posiblemente pueden afectar a los resultados finales, además de otras variables "habituales". En la tabla del diseño experimental de Youden y Steiner se otorgan dos valores a siete variables diferentes (tabla IV.21). En mayúsculas los valores "nominales" para cada variable (A, B, C, D, E, F, G) y en minúsculas los valores "modificados" (a, b, c, d, e, f, g). Se efectúan 8 análisis de la muestra (patrón de 100 ng/L) y cada análisis es una combinación diferente de las siete variables. Para cada una de ellas, existen 4 combinaciones en mayúsculas (AAAA) y 4 combinaciones en minúsculas (aaaa).

Tabla IV.21 Diseño experimental de Youden y Steiner

Valores de las variables	Análisis							
	R-1	R-2	R-3	R-4	R-5	R-6	R-7	R-8
A,a	A	A	A	A	a	a	a	a
B,b	B	B	b	b	B	B	b	b
C,c	C	c	C	c	C	c	C	c
D,d	D	D	d	d	d	d	D	D
E,e	E	e	E	e	e	E	e	E
F,f	F	f	f	F	F	f	f	F
G,g	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultados	s	t	u	v	w	x	y	z

Para aplicar este procedimiento, se han elegido los siete parámetros descritos en la tabla IV.22. en la que aparecen los valores nominales y modificados. La matriz de diseño de los ocho experimentos aparece en la tabla IV.23.

Tabla IV.22. Variables elegidas para el análisis de la robustez

Nº	Variables	Valor nominal	Valor modificado
1	Tª incubación	100 °C	98 °C
2	Tª inyección	250 °C	248 °C
3	Tiempo extracción	30 min	29 min
4	Tiempo desorción	5 min	4,8 min
5	Sal	2 g	1,9 g
6	Flujo	1 mL/min	0,9 mL/min
7	Volumen de muestra	10 ml	9,8 ml

Tabla IV.23. Matriz de diseño de condiciones de análisis

Robustez	Letras	R-1	R-2	R-3	R-4	R-5	R-6	R-7	R-8
Tª incubación	A, a	100	100	100	100	98	98	98	98
Tª inyección	B, b	250	250	248	248	250	250	248	248
Tiempo extracción	C, c	30	29	30	29	30	29	30	29
Tiempo desorción	D, d	5	5	4,8	4,8	4,8	4,8	5	5
Flujo	E, e	1	0,9	1	0,9	0,9	1	0,9	1
Sal	F, f	2	1,9	1,9	2	2	1,9	1,9	2
Volumen de muestra	G, g	10	9,8	9,8	10	9,8	10	10	9,8

Robustez	Letras	R-1	R-2	R-3	R-4	R-5	R-6	R-7	R-8
Resultados		s	t	u	v	w	x	y	z

Los resultados obtenidos figuran en la tabla IV.24.

Tabla IV.24. Resultados de los ensayos de robustez en ng/L de fragancia

Fragancias	Concentración (ng/L)							
	R-1	R-2	R-3	R-4	R-5	R-6	R-7	R-8
MA	99,94	99,78	99,73	99,81	99,21	99,55	98,54	99,91
MC	100,1	94,76	99,45	98,18	97,45	91,99	93,34	91,74
MX	100,3	94,99	98,53	98,93	96,13	94,93	91,47	90,15
G total	99,91	96,38	99,33	99,40	89,90	98,63	90,64	91,98
T	99,89	96,93	96,00	99,86	92,92	98,53	91,54	91,29
Resultados	s	t	u	v	w	x	y	z

Los resultados se indican por las letras “s, t, u, v, w, x, y, z “. A partir de los resultados puede calcularse el efecto de los cambios en cada una de las variables. Para ello se calcula la media de los cuatro análisis que contienen la variable en su valor nominal (mayúsculas) y aquéllos que corresponden al valor modificado (minúsculas). A continuación se calculan las diferencias V.

Así para la variable A, el valor V se mide por la diferencia:

$$((s+t+u+v)/4) - (w+x+y+z)/4))$$

Es decir, la media de los resultados (s+t+u+v) corresponde a los experimentos en los que la variable figuraba en su valor nominal mientras que la media de los resultados (w + x + y + z) equivale a los experimentos en los que la variable figura en su valor modificado..

Tabla IV.25. Resultados de la influencia de factores.

Fragancias	V _{A, a}	V _{B, b}	V _{C, c}	V _{D, d}	V _{E, e}	V _{F, f}	V _{G, g}
MA	0,51	0,12	0,41	0,03	0,45	0,32	0,20
MC	4,49	0,40	3,42	1,78	0,11	1,98	0,05

Fragancias	V _{A, a}	V _{B, b}	V _{C, c}	V _{D, d}	V _{E, e}	V _{F, f}	V _{G, g}
MX	5,02	1,82	1,86	2,90	0,60	1,39	1,46
G	5,96	0,87	1,65	2,09	3,38	0,95	2,75
T	4,60	2,39	1,56	1,91	1,11	0,24	3,17
V Media	4,12	1,12	1,78	1,74	1,13	0,98	1,52
Ranking	1º	6º	2º	3º	5º	7º	4º

Estos resultados indican englobando todas las fragancias, que los factores que más influyen son: La temperatura de incubación, seguida del tiempo de extracción y en tercer puesto, el tiempo de desorción de los compuestos, como se puede observar en el ranking de la tabla IV.25.

Una vez analizado de forma cualitativa los resultados del ensayo se va a proceder a hacerlo de forma cuantitativa. El criterio de aceptación para evaluar el ensayo de robustez del método que se considera es que la diferencia V entre el valor nominal y el modificado sea inferior a la raíz cuadrada de dos por la desviación estándar, si esto se cumple no hay diferencias significativas entre los parámetros evaluados. Así, para el parámetro A , si $|A - a| \geq SD \cdot \sqrt{2}$ hay diferencia significativa del parámetro evaluado en el rango asignado (SD es la desviación estándar obtenida para los ocho resultados del ensayo).

En la tabla IV.26. se incluyen los cálculos realizados de estos parámetros para los distintos compuestos.

Tabla IV.26. Evaluación de los resultados de Robustez

Fragancias	Media R (ppt)	SD (ppt)	% RSD	A (ppt)	a (ppt)	Va= A-a	SD*Raíz (2)
MA	99,56	0,47	0,47	99,82	99,30	0,51	0,67
MC	95,88	3,34	3,48	98,12	93,63	4,49	4,73
MX	95,68	3,58	3,74	98,19	93,17	5,02	5,06
HHCB	95,77	4,25	4,43	98,75	92,79	5,96	6,01
AHTN	95,87	3,56	3,71	98,17	93,57	4,60	5,03

De dichos resultado se deduce que en todos los casos, los resultados de las diferencias son menores que el criterio de aceptación indicado. Se puede concluir que no hay diferencia significativa de los parámetro evaluado en los rangos asignados.

Otro criterio de aceptación es que la diferencia entre los valores en las diferentes condiciones no presenten un RSD $\geq 20\%$, según la guía SANTE. Esta condición también se cumple pues el RSD máximo es de 4,25 % y por tanto inferior al estipulado por la guía SANTE.

3.6. Incertidumbre

3.6.1. Introducción

La incertidumbre, U, es un parámetro asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que pueden atribuirse razonablemente al mensurando, es considerada como una medida metrológica fundamental, y su estimación pretende considerar todas las posibles fuentes de error que aportan en el resultado final de medida (Serna et al., 2012). Desde un punto de vista práctico es el intervalo dentro del que se espera encontrar el valor real de aquello que mide. El resultado R estaría dentro del intervalo $R \pm U$.

Hay dos aproximaciones o estrategias para el cálculo de la incertidumbre.

1. Procedimiento por etapas. Identificación y combinación de todos los orígenes de incertidumbre asociada con la medida. Es el método denominado “Bottom-Up” basado en la Guía EURACHEM “Quantifying Uncertainty in Analytical Measurements”2000 y en la Guía ISO IEC OIML BIMP “Guide to the expression of Uncertaintyin Measurements”1992.

2. Procedimiento global. Es el método denominado “Black-Box”. El proceso analítico se contempla como una “caja negra” desde el punto de vista

metrológico. No se distinguen etapas. Se utilizan los datos obtenidos durante el proceso de validación de la exactitud (veracidad) y la precisión.

En el presente trabajo de investigación se ha utilizado el procedimiento global según se describe a continuación

3.6.2. Cálculo de incertidumbre del método

Este cálculos de incertidumbre se aplica al análisis de Fragancias en agua, mediante HS-SPME por CG/MS/MS, en un proceso automatizado con automuestreador combipal. En esta etapa se procedería a la incubación, extracción y desorción de la fibra en el inyector.

Para la aplicación de este procedimiento de cálculo es necesario disponer de un material certificado de referencia de concentración próxima a las muestras a analizar y se analizaría por el método analítico que se está validando en condiciones idénticas a las que realizaríamos a las muestras (Chaparro, 2012). El análisis se repetiría distintas veces en condiciones de reproducibilidad. A partir de estas experiencias se calcularían la media y su desviación estándar. En caso de no disponer de estos materiales, pueden aplicarse el método adicionando cantidades conocidas de patrones certificados a las muestras a analizar.

El método se basa en:

- Disponer de un material o patrón de referencia cuyo certificados, pueda garantice unos niveles de concentración próximos a los de nuestras muestras a analizar.
- Realizarle una serie de ensayos, idénticos a los que realizaríamos a nuestra muestra, mediante repeticiones sucesivas y realizadas en distintos días.
- Calcular las medias y las desviaciones estándar de los ensayos practicados repetidamente.

1. Se calculará la Media (X) y su Desviación Típica (SD):

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n (X - x_i)^2}{n - 1}}$$

2. La incertidumbre combinada se calcula de acuerdo con la siguiente expresión:

$$U_{comb} = \sqrt{U_{precisión}^2 + U_{exactitud}^2}$$

Donde:

$$U_{precisión} = W \frac{S}{\sqrt{3}}$$

En función del número de repeticiones de medidas (n) que se realicen, la Desviación Típica (SD) se multiplicará por un factor W, para calcular la contribución a la Incertidumbre Combinada de la serie de medidas. Siendo: W: Factor de seguridad, función del número n de repeticiones realizadas. Como el número de repeticiones en la validación ha sido 10 o más, W=1.

$$U_{exactitud} = \frac{\text{corrección}}{\sqrt{3}}$$

Siendo:

$$\text{Corrección} = |\text{concentración medida} - \text{concentración real}|$$

3. Finalmente, a partir de la incertidumbre combinada se calcula una incertidumbre expandida de acuerdo con esta expresión:

$$U_{expandida} = K \cdot U_{combinada}$$

La incertidumbre calculada es para un nivel de confianza del 95% (k=2)

Considerando que la incertidumbre está relacionada con la concentración del compuesto, los resultados del análisis de las fragancias en agua, deben expresarse como:

$$C \pm U_{E(\text{Fragancias})} \times C$$

Donde:

C: Concentración de la fragancia en la muestra

$U_{\text{Expandida}}$ (%), redondeando al número entero más próximo.

El procedimiento anterior se ha realizado adicionando patrones a tres niveles de concentración. Los resultados obtenidos se detallan en las siguientes tablas IV.27, IV.28 y IV.29.

Tabla IV.27. Incertidumbre de los patrones de control de 25 ppt en aguas

Analitos	Media	SD	N>5	Corrección	U exactitud	U precisión	U combinada	U expandida	% U expandida	W
MA	24,54	3,16	10	0,46	0,27	1,82	1,84	3,69	14,75	1
MK	23,76	3,22	10	1,24	0,72	1,86	1,99	3,98	15,94	1
MX	23,48	2,42	10	1,52	0,88	1,40	1,65	3,30	13,20	1
HHCB	26,89	2,19	10	1,89	1,09	1,26	1,67	3,34	13,36	1
AHTN	24,75	2,04	10	0,25	0,14	1,18	1,19	2,37	9,49	1

Tabla IV.28. Incertidumbre de los patrones de control de 100 ppt en aguas

Analitos	Media	SD	N>5	Corrección	U exactitud	U precisión	U combinada	U expandida	% U expandida	W
MA	100,12	8,85	10	0,12	0,07	5,11	5,11	10,22	10,22	1
MK	93,82	7,67	10	6,18	3,57	4,43	5,69	11,37	11,37	1
MX	97,69	9,91	10	2,31	1,33	5,72	5,87	11,75	11,75	1
HHCB	103,53	10,17	10	3,53	2,04	5,87	6,22	12,43	12,43	1
AHTN	107,81	12,3	10	7,81	4,51	7,10	8,41	16,82	16,82	1

Tabla IV.29. Incertidumbre de los patrones de control de 250 ppt en aguas

Analitos	Media	SD	N>5	Corrección	U exactitud	U precisión	U combinada	U expandida	% U expandida	W
MA	239,59	17,56	10	10,41	6,01	10,14	11,79	23,57	9,43	1
MK	232,92	25,59	10	17,08	9,86	14,77	17,76	35,53	14,21	1
MX	224,52	26,99	10	25,48	14,71	15,58	21,43	42,86	17,14	1
HHCB	236,59	26,06	10	13,41	7,74	15,05	16,92	33,84	13,54	1
AHTN	244,64	28,24	10	5,36	3,09	16,30	16,60	33,19	13,28	1

Los resultados obtenidos nos indican valores de incertidumbres que varían en general entre 9,43 % y 17,14%, teniendo en cuenta que el análisis se realiza en concentraciones de ng/L, se consideran valores muy aceptables.

Se puede apreciar la variación de la incertidumbre para cada fragancia, siendo para MA (9,43 - 14,75 %), MK (11,37 -15,94 %), MX (11,75 - 17,14 %), HHCB (12,43 - 13,54 %) y AHTN (9,49 - 16,82 %). Donde se observa que los valores de galaxolide varían muy poco entre ellos y los que más difieren son los del tonalide.

Considerando que en este método no se ha detectado efecto matriz, se puede considerar que estos valores de incertidumbre son equivalentes a las diferentes matrices estudiadas como son agua de río, agua de mar y aguas residuales. Para que el rango de incertidumbre cubra todas las concentraciones, se considera el valor de incertidumbre más alto (valores sombreados en la tabla IV.29) para cada fragancia, el de aplicación en las muestras reales.

Estos valores calculados de incertidumbre son los que se han aplicado a los resultados obtenidos en el capítulo V sobre muestras reales según la expresión indicada más arriba.

3.7. Resumen y conclusiones de la validación de los parámetros de calidad de la determinación analítica

En modo de resumen de los parámetros de calidad estudiados en este apartado tercero, sería:

- Los valores de selectividad y especificidad fueron validados con la elección de un ión cuantificador y dos iones cualificados, permitiendo una tolerancia en la relación de los iones menor de la permitida.
- La linealidad fue evaluada por diferentes métodos: según su coeficiente de correlación, porcentaje de linealidad, residuales, varianza de las residuales y sensibilidad. Concluyendo en todos los casos que la respuesta es lineal.

- La veracidad fue evaluada mediante el cálculo de recuperaciones sobre muestras reales, obteniendo recuperaciones aceptables según la guía SANTE y la AOAC. No teniendo efecto matriz, en ninguna muestra.
- La precisión fue evaluada mediante la repetitividad y la precisión intermedia, no obteniendo valores superiores al 20 %, que es el rango más restrictivos de los evaluados (SANTE, AOAC y Horwitz).
- Los límites de detección y cuantificación se encuentran en rangos de pocos ng/L, llegando a valores de pg/L para galaxolide y tonalide. Siendo valores muy adecuados para esta aplicación.
- La robustez fue satisfactoria para los rangos elegidos, no observándose valores significativos que perturben los resultados.
- Por último se calculo la incertidumbre en patrones certificados, obteniendo valores aceptables para los niveles de concentración estudiados, tampoco en este caso se obtienen valores superiores al 20%.

Se concluye que el método propuesto es adecuado para los compuestos y matrices seleccionadas, al cumplir todos los criterios de validación exigidos.

CAPÍTULO V

APLICACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA A MUESTRAS REALES

1. Introducción

Una vez validado el método procedió a evaluar su aplicabilidad en muestras reales, de distinto tipo: de aguas superficiales como serian las aguas de río, agua de mar y aguas residuales urbanas. Se realizo el muestreo a lo largo de un año en las distintas estaciones (primavera, verano, otoño e invierno), para comprobar si se observa alguna tendencia o cambio a lo largo del tiempo y/o con los cambios climáticos. Fueron seleccionados 11 puntos de muestreo (en cada uno de los cuatro muestreos realizados, haciendo un total de 44 muestras, todas ellas medidas 10 veces), los resultados se presentan a continuación. La incertidumbre de los resultados se calculo de acuerdo con los valores obtenidos durante el proceso de validación del método realizado en el capítulo anterior.

En el presenta capítulo se presentan los resultados obtenidos para los distintos compuestos estudiados en esta Tesis en los diferentes puntos de muestreo. De manera preliminar se presentan los resultados de pH y conductividad, parámetros que también fueron medidos por las razones que se indican más abajo.

Finalmente, se presenta un estudio cualitativo sobre otros contaminantes emergentes detectados con el método analítico desarrollado en esta Tesis Doctoral y que podrían ser estudiados en un futuro en este tipo de muestras.

2. Resultados de pH y conductividad eléctrica

Se llevaron a cabo medidas de pH de todas las muestras recogidas en las diferentes estaciones, como se puede observar en la siguiente tabla V.1. Se realizaron estas medidas debido a que la fibra tiene un rango de trabajo de pH, que como se suponía no sería un problema en este tipo de muestras de aguas. Todas las muestras presentan un pH, entre 6,74 y 7,93; considerándose un pH neutro, que no afectaría a la fibra en ningún caso.

Tabla V.1. Resultados de pH de todas las muestras recogidas en las diferentes estaciones del año.

Aguas	Localización de Muestras	pH			
		Primavera	Verano	Otoño	Invierno
Río Guadaira	Alcalá de Guadaira	7,75	6,74	7,73	7,75
	Bellavista	7,49	7,23	7,64	7,65
Río Guadalquivir	Coria (río)	7,60	7,34	7,93	7,56
	Sevilla (dársena)	7,84	7,46	7,78	7,75
Mar	Costa de Huelva	7,90	7,76	7,57	7,45
EDAR CENTA (población pequeña)	CENTA Entrada	6,90	7,14	7,40	7,75
	CENTA salida primario	6,87	7,39	7,51	7,36
	CENTA salida secundario	7,48	7,75	7,83	7,56
EDAR Copero (población grande)	Copero entrada	6,77	7,07	6,88	7,49
	Copero salida primario	7,33	7,40	6,99	7,58
	Copero salida secundario	7,34	7,57	7,85	7,70

También se realizó la medida de la conductividad eléctrica de las muestras (tabla V.2), debido a que es un indicativo de la cantidad de iones que hay disueltos en el medio, un valor de conductividad alto, indica un valor de contaminación superior en las aguas, que podría estar relacionado con los valores más altos de fragancias muestreados. Los resultados más altos corresponden a los de agua de mar debido a la salinidad de la misma. Eliminando la muestra de agua de mar, la conductividad oscila entre los 675 $\mu\text{S}/\text{cm}$ de Alcalá de Guadaira en otoño y la muestra de entrada al CENTA de 2912 $\mu\text{S}/\text{cm}$, de la misma estación del año. Las muestras de salida del secundario de las EDAR presentan una disminución de la conductividad eléctrica en todas las estaciones. Las muestras de agua de río, se destacaría la alta conductividad de las muestras de la dársena de Sevilla. No obstante, estos valores altos no se corresponden con altas concentraciones de almizcles como se verá más adelante.

Tabla V.2. Resultados de conductividad eléctrica de todas las muestras recogidas en las diferentes estaciones del año.

Aguas	Localización de Muestras	Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$)			
		Primavera	Verano	Otoño	Invierno
Río Guadaira	Alcalá de Guadaira	1127	888	675	911
	Bellavista	1185	1220	1287	791
Río Guadalquivir	Coria (río)	778	709	843	1403
	Sevilla (dársena)	2023	2033	1745	2130
EDAR CENTA (población pequeña)	CENTA Entrada	1160	1099	2912	1207
	CENTA salida Primario	1113	1085	1130	1182
	CENTA salida Secundario	1053	849	871	798
EDAR Copero (población grande)	Copero Entrada	1485	1595	1432	1103
	Copero salida Primario	1500	1424	1428	1113
	Copero Salida Secundario	1429	1182	1275	965
Mar	Costa de Huelva	Conductividad (mS/cm)			
		48,5	49,7	49,9	49,7

3. Concentraciones de fragancias en muestras de agua de río

Las muestras tomadas en Alcalá de Guadaira y Bellavista, son las pertenecientes al Río Guadaira. Las muestras tomadas en Sevilla centro y Coria del Río, pertenecen a la dársena y al cauce del Río Guadalquivir respectivamente. Estas cuatro muestras constituirían las muestras de agua de río, todas ellas en la provincia de Sevilla.

3.1. Río Guadalquivir

Se tomaron muestras en el río Guadalquivir, en su paso por el centro de la ciudad, a la altura de Plaza de Armas, esta parte del río es una dársena. Un segundo punto de muestreo en Coria del Río, en el cauce más alejado del núcleo urbano y antes de llegar a su desembocadura.

Se obtuvieron los resultados que se observan en la tabla V.3, donde los valores son bajos en todas las fragancias y prácticamente constantes en el año para el galaxolide y tonalide, este último no se detecta en verano. En el caso de los almizcles nitro, solo se detectan dos de ellos en primavera como es el almizcle xileno y el almizcle cetona.

Tabla V.3. Resultados de fragancias de las muestras recogidas en la dársena del río Guadalquivir en Sevilla en las cuatro estaciones del año en ng/L.

Dársena río Guadalquivir (Sevilla)	Fragancias (ng/L)				
	MA	MC	MX	G	T
Primavera	≤ 4,68	12,60 ± 2,02	23,04 ± 3,92	24,29 ± 3,40	20,22 ± 3,43
Verano	≤ 4,68	≤ 2,19	≤ 1,14	15,13 ± 2,11	≤ 0,04
Otoño	≤ 4,68	≤ 2,19	≤ 1,14	11,37 ± 1,59	12,40 ± 2,11
Invierno	≤ 4,68	≤ 2,19	≤ 1,14	6,18 ± 0,87	5,99 ± 1,02
Valor medio anual	≤ 4,68	3,15	5,76	14,24	9,65
Rango	≤ 4,68	≤ 2,19 - 12,60	≤ 1,14 - 23,04	6,18 - 24,29	≤ 0,04 - 20,22

Las muestras de Coria del Río tienen valores superiores, en el paso del río Guadalquivir por esta zona, como se puede observar en la tabla V.4. El valor que mas aumenta es el de Galaxolide, que dentro del mismo muestreo llega a ser más de 50 veces superior al de los valores obtenidos en Sevilla centro. Los valores de Tonalide se mantienen prácticamente constantes a lo largo del año y son similares a los de Sevilla. El almizcle xileno solo se detecta también en primavera y en la misma cantidad que en el otro punto de muestreo y el almizcle cetona, se detecta en otoño y primavera, que en esta provincia tienen una climatología muy parecida en estas estaciones.

Tabla V.4. Resultados de fragancias de las muestras recogidas en el río Guadalquivir en Coria del Río en las cuatro estaciones del año en ng/L.

Cauce río Guadalquivir (Coria del río)	Fragancias (ng/L)				
	MA	MC	MX	G	T
Primavera	≤ 4,68	24,70 ± 3,95	25,00 ± 4,25	157,75 ± 22,09	30,02 ± 5,10
Verano	≤ 4,68	≤ 2,19	≤ 1,14	103,20 ± 14,45	6,65 ± 0,64
Otoño	≤ 4,68	12,50 ± 2,00	≤ 1,14	127,00 ± 17,78	13,50 ± 1,13
Invierno	≤ 4,68	≤ 2,19	≤ 1,14	325,20 ± 45,53	12,66 ± 2,30

Cauce río Guadalquivir (Coria del río)	Fragancias (ng/L)				
	MA	MC	MX	G	T
Valor medio anual	≤ 4,68	9,30	6,25	178,29	15,71
Rango	≤ 4,68	≤ 2,19 - 24,70	≤ 1,14 - 25,00	103,20 - 325,20	6,65 - 30,02

3.2. Río Guadaira

Como se indico en el capítulo II, se seleccionaron dos puntos de muestreo en uno de los afluentes del río Guadalquivir, como es el Río Guadaira, a su paso por la población de Alcalá de Guadaira (en el puente del Dragón) y un segundo punto antes de recibir el efluente depurado de la EDAR Copero, donde se encuentra la casetilla de control de la red SAICA en el barrio de Bellavista.

Los resultados de las muestra tomadas en Alcalá de Guadaira, se pueden observar en la tabla V.5, donde se destacaría los valores de Galaxolide en el muestreo de invierno y verano, prácticamente iguales, siendo superiores en las otras dos estaciones. Esto mismo ocurre también con el resto de las fragancias. El almizcle xileno es detectado en primavera en este efluente, en concentraciones similares a las anteriores.

Tabla V.5. Resultados de fragancias de las muestras recogidas en Alcalá de Guadaira en las cuatro estaciones del año en ng/L.

Río Guadaira (Alcalá de Guadaira)	Fragancias (ng/L)				
	MA	MC	MX	G	T
Primavera	≤ 4,68	53,94 ± 8,63	33,59 ± 5,71	65,44 ± 9,16	39,81 ± 6,77
Verano	≤ 4,68	≤ 2,19	≤ 1,14	32,50 ± 4,55	3,02 ± 0,51
Otoño	≤ 4,68	19,46 ± 3,11	≤ 1,14	117,48 ± 16,44	20,69 ± 3,52
Invierno	≤ 4,68	≤ 2,19	≤ 1,14	35,69 ± 5,00	6,97 ± 1,19
Valor medio anual	≤ 4,68	18,35	8,40	62,78	17,62
Rango	≤ 4,68	≤ 2,19 - 53,94	≤ 1,14 - 33,59	32,50 - 117,48	3,02 - 39,81

Los resultados de las muestra tomadas en Bellavista, se pueden observar en la tabla V.6, donde se destacaría el valor del Galaxolide que llega

a los $\mu\text{g/L}$, en las muestras de invierno, siendo los datos más altos obtenidos en aguas superficiales de río. Se detecta almizcle cetona en todas las muestras recogidas en esta localización. En general todas las fragancias tienen concentraciones superiores a los muestreos anteriores. En este caso no se detecta ni almizcle ambreta, ni almizcle xileno, a lo largo del año.

Tabla V.6. Resultados de fragancias de las muestras recogidas en Bellavista en las cuatro estaciones del año en ng/L .

Río Guadaira (Bellavista)	Fragancias (ng/L)				
	MA	MC	MX	G	T
Primavera	$\leq 4,68$	$29,23 \pm 4,68$	$\leq 1,14$	$936,85 \pm 131,16$	$95,79 \pm 16,28$
Verano	$\leq 4,68$	$44,18 \pm 7,07$	$\leq 1,14$	$147,90 \pm 20,71$	$112,30 \pm 19,10$
Otoño	$\leq 4,68$	$91,24 \pm 14,60$	$\leq 1,14$	$643,00 \pm 90,02$	$53,60 \pm 9,11$
Invierno	$\leq 4,68$	$71,36 \pm 11,42$	$\leq 1,14$	$1028,30 \pm 143,96$	$21,19 \pm 3,60$
Valor medio anual	$\leq 4,68$	59,00	$\leq 1,14$	689,01	70,72
Rango	$\leq 4,68$	29,23 - 91,24	$\leq 1,14$	147,90 - 1028,30	21,19 - 112,30

3.3. Resumen de los resultados obtenidos en aguas de río

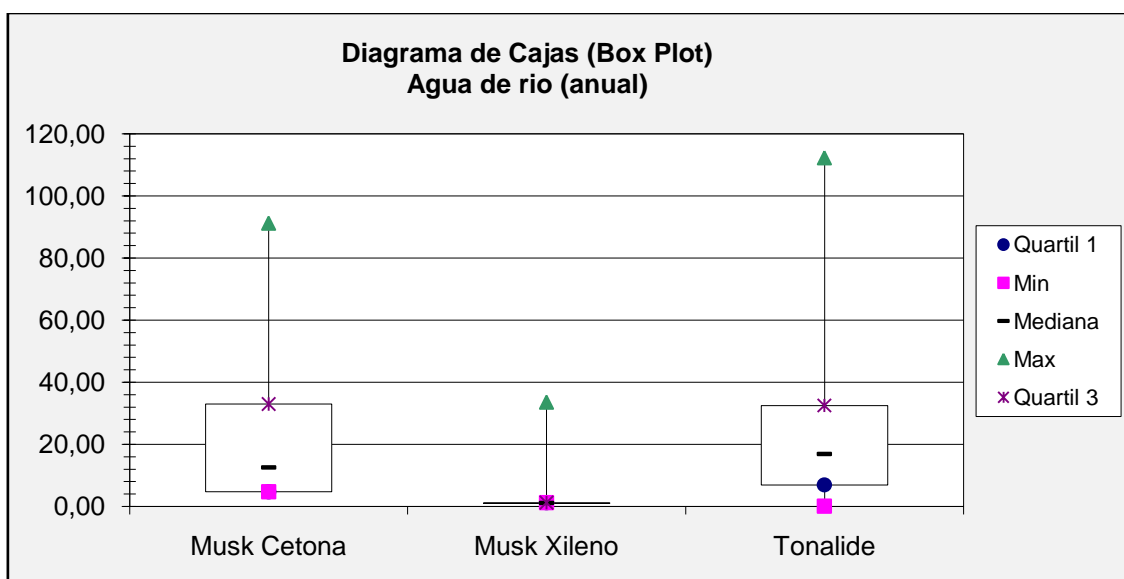
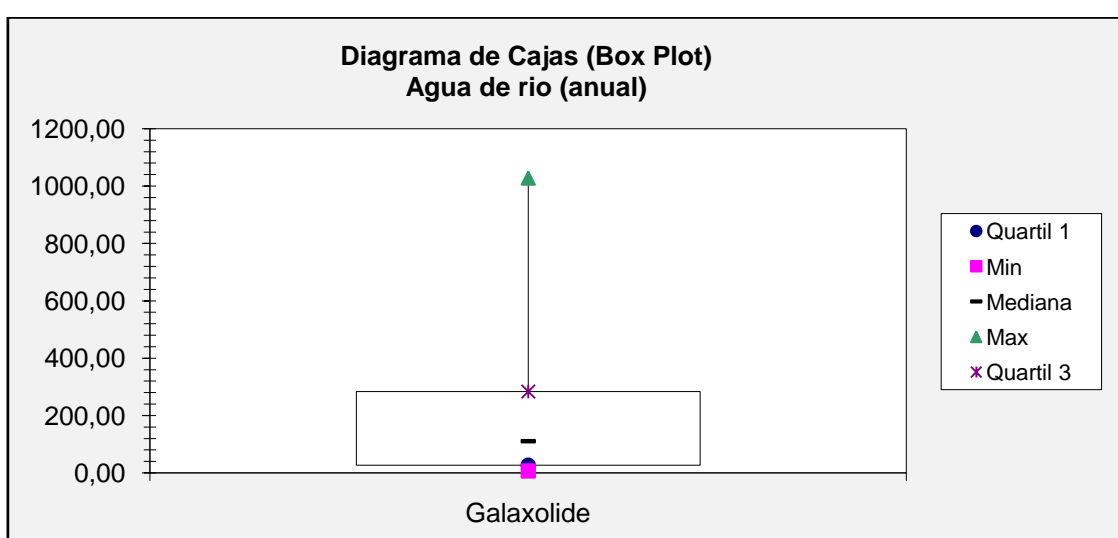
Los resultados medios anuales de todos los muestreos del año se representan en los diagramas de caja y bigote.

Un diagrama de caja y bigotes (Arcidiacono, 2014), muestra una representación gráfica de la distribución de datos, señalando donde caen la mayoría de los valores y los valores que difieren considerablemente de la norma (valores atípicos). Las líneas verticales que sobresalen de la caja, el 'bigotes', se extienden, respectivamente, hasta el mínimo y el máximo del conjunto de datos, siempre que estos valores no difieren de la media de más de una vez y medio el rango intercuartílico.

En la tabla V.7 se presentan los parámetros característicos de estos diagramas para las diferentes fragancias y en las, figuras V.1 y V.2, se representan los mismos.

Tabla V.7. Valores relacionados con las gráficas de caja y bigote.

Datos Caja y bigote (agua de río)	MC (ng/L)	MX (ng/L)	G (ng/L)	T (ng/L)
Población	16	16	16	16
Mediana	13	1	110	17
Mínimo	5	1	6	0
Máximo	91	34	1028	112
1º Cuartil	5	1	26,25	7
3º Cuartil	40,25	1	283,25	37,5
Rango intercuartilico	35,25	0	257	30,5
Outlet	91; 71;	34; 25; 23;	1028; 937; 643;	112; 96;

**Figura V.1.** Diagrama de caja y bigote anual para MC, MX y T.**Figura V.2.** Diagrama de caja y bigote anual para Galaxolide

De los diagramas se destacan los valores que difieren de la media de más de una vez y medio el rango intercuartílico. Estos valores se superan, para galaxolide para los valores: 1028; 936; y 643; En el tonalide para los datos: 112 y 96; En el almizcle cetona en los valores: 91 y 71. Todos ellos corresponden al tramo del cauce del río que pasa por Bellavista (punto de la red SAICA), considerándose atípicos en comparación con los otros tres puntos de muestreo. La representación de caja para el almizcle xileno, no se considera representativa al solo tener tres valores por encima de límite de detección del equipo.

4. Muestras de agua de mar

Las muestras de agua de mar se tomaron en la provincia de Huelva, en las playas de Punta Umbría, Punta del Moral, Mazagón y El Espigón, todas ellas tomadas desde la orilla.

Los resultados de las muestra tomadas en la costa de Huelva, se pueden observar en la tabla V.8 y en la figura V.3, donde se observan valores muy pequeños en todas las fragancias y prácticamente constante a lo largo del año, incluyendo los valores de Galaxolide que es la fragancia que se utiliza en mayores cantidades en la industria. Tampoco se obtiene ningún valor atípico en el diagrama de caja y bigote. Se podría, decir que es el agua más limpia en fragancias de las muestreadas.

Tabla V.8. Resultados de fragancias de las muestras recogidas en la playa en las cuatro estaciones del año en ng/L.

Agua de mar	Fragancias (ng/L)				
	MA	MC	MX	G	T
Primavera	≤ 4,68	6,16 ± 0,99	23,04 ± 3,92	4,42 ± 0,62	18,89 ± 3,21
Verano	≤ 4,68	≤ 2,19	≤ 1,14	1,55 ± 0,22	≤ 0,04
Otoño	≤ 4,68	5,33 ± 0,85	≤ 1,14	7,66 ± 1,07	9,17 ± 1,56
Invierno	≤ 4,68	≤ 2,19	≤ 1,14	10,22 ± 1,43	0,50 ± 0,09
Valor medio anual	≤ 4,68	2,87	5,76	5,96	7,14
Rango	≤ 4,68	≤ 2,19 - 6,16	≤ 1,14 - 23,04	1,55 - 10,22	≤ 0,04 - 18,89

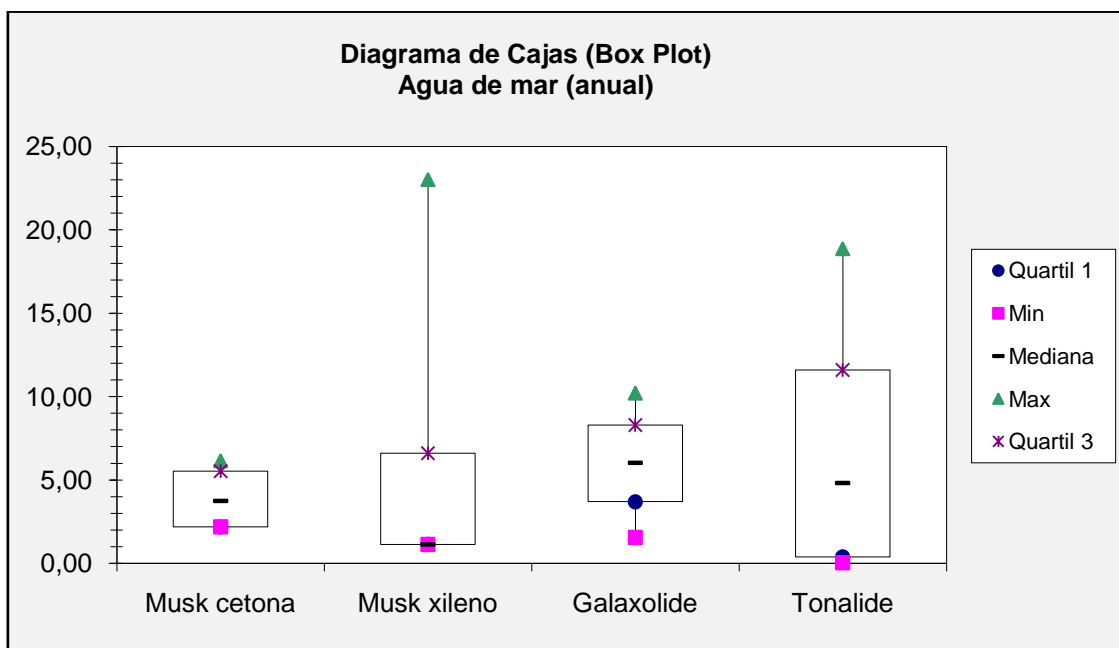


Figura V.3. Diagrama de caja y bigote anual para las muestras de agua de mar.

5. Muestras de aguas residuales urbanas

En este apartado se presentan los resultados de las muestras de aguas residuales urbanas, de las dos estaciones de depuración de aguas residuales como son el Copero y el CENTA.

5.1. EDAR Copero

Este apartado se subdivide en los tres puntos de muestreos detallados en el Capítulo II, correspondientes a la entrada a la depuradora, salida del proceso primario y del secundario (o salida de planta).

5.1.1. Entrada Copero

Los resultados obtenidos del agua bruta de entrada a la EDAR Copero, están indicados en la tabla V.9. Los valores obtenidos indican que la fragancia que se encuentra en mayor cantidad en las aguas residuales es el Galaxolide, donde está se encuentran en cantidades de $\mu\text{g/L}$, en todas las estaciones del

año, en valores entre 7 y 22 µg/L. El almizcles cetona y el Tonalide, se encuentra en cantidades inferiores a 2 µg/L. Mientras que el Almizcle Ambreta, no se detecta en ninguna muestra y el almizcle xileno, solo se obtienes en pocos ng/L.

Tabla V.9. Resultados de fragancias de las muestras recogidas a la entrada de la EDAR Copero en las cuatro estaciones del año en ng/L.

Entrada Copero	Fragancias				
	MA (ng/L)	MC (ng/L)	MX (ng/L)	G (µg/L)	T (ng/L)
Primavera	≤ 4,68	524,60 ± 83,94	10,55 ± 1,79	17,65 ± 2,47	1890,80 ± 321,44
Verano	≤ 4,68	708,50 ± 113,36	≤ 1,14	7,03 ± 0,98	989,50 ± 168,22
Otoño	≤ 4,68	1450,55 ± 232,09	14,63 ± 2,49	22,07 ± 3,09	990,05 ± 168,31
Invierno	≤ 4,68	922,99 ± 147,68	1,94 ± 0,33	15,05 ± 2,11	90,29 ± 15,35
Valor medio anual	≤ 4,68	901,66	6,78	15,45	990,16
Rango	≤ 4,68	524,60 - 1450,55	≤ 1,14 - 14,63	7,03 - 22,07	90,29 - 1890,80

5.1.2. Salida del tratamiento primario de la EDAR Copero

Los resultados obtenidos del agua procedente de la salida del tratamiento primario de la EDAR Copero, están indicados en la tabla V.10. Los valores obtenidos, son inferiores en todos los casos a los del agua bruta. Tras este tratamiento, solo se detectan almizcle xileno en las muestras tomadas en otoño. La eficacia en porcentaje de estos procesos se desarrollara en próximos apartados.

Tabla V.10. Resultados de fragancias de las muestras recogidas a la salida del tratamiento primario de la EDAR Copero en las cuatro estaciones del año en ng/L.

Copero salida de primario	Fragancias				
	MA (ng/L)	MC (ng/L)	MX (ng/L)	G (µg/L)	T (ng/L)
Primavera	≤ 4,68	416,01 ± 66,56	≤ 1,14	13,46 ± 1,88	1725,80 ± 293,39
Verano	≤ 4,68	576,00 ± 92,16	≤ 1,14	3,58 ± 0,50	798,50 ± 135,75
Otoño	≤ 4,68	1023,21 ± 163,71	7,96 ± 1,35	20,95 ± 2,93	234,50 ± 39,87

Copero salida de primario	Fragancias				
	MA (ng/L)	MC (ng/L)	MX (ng/L)	G ($\mu\text{g/L}$)	T (ng/L)
Invierno	$\leq 4,68$	$613,96 \pm 98,23$	$\leq 1,14$	$14,41 \pm 2,02$	$49,92 \pm 8,49$
Valor medio anual	$\leq 4,68$	657,29	1,99	13,01	702,18
Rango	$\leq 4,68$	416,01 - 1023,21	$\leq 1,14 - 7,96$	3,58 - 20,95	49,92 - 1725,80

5.1.3. Salida del tratamiento secundario de la EDAR Copero

Los resultados obtenidos del agua procedente de la salida del tratamiento secundario de la EDAR Copero, están indicados en la tabla V.11. Los valores obtenidos, son inferiores a los obtenidos en la salida del proceso primario, con lo cual en este proceso también se elimina parte de las fragancias presentes en el agua. El almizcles xileno desaparece completamente. Las concentraciones han descendido bastante, llegando solo a pocos $\mu\text{g/L}$ para el Galaxolide.

Tabla V.11. Resultados de fragancias de las muestras recogidas a la salida del tratamiento secundario de la EDAR Copero en las cuatro estaciones del año en ng/L.

Copero salida de secundario	Fragancias				
	MA (ng/L)	MC (ng/L)	MX (ng/L)	G ($\mu\text{g/L}$)	T (ng/L)
Primavera	$\leq 4,68$	$319,80 \pm 51,17$	$\leq 1,14$	$6,92 \pm 0,97$	$829,40 \pm 141,00$
Verano	$\leq 4,68$	$87,92 \pm 14,07$	$\leq 1,14$	$1,89 \pm 0,26$	$192,74 \pm 32,77$
Otoño	$\leq 4,68$	$211,60 \pm 33,86$	$\leq 1,14$	$2,58 \pm 0,40$	$94,34 \pm 16,04$
Invierno	$\leq 4,68$	$428,76 \pm 68,60$	$\leq 1,14$	$4,57 \pm 0,64$	$36,76 \pm 6,25$
Valor medio anual	$\leq 4,68$	262,02	$\leq 1,14$	4,06	288,31
Rango	$\leq 4,68$	97,92 - 428,76	$\leq 1,14$	1,89 - 4,57	36,76 - 829,40

La eliminación de estos microcontaminantes no se produciría completamente, vertiéndose a la salida de la planta de tratamiento de aguas residuales parte de estos compuestos de nuevo al medioambiente, es decir, a los ríos y mares.

5.2. EDAR CENTA

Se tomaron muestras en la Planta Experimental del Centro de las Nuevas Tecnologías del Agua en Carrión de los Céspedes, en los tres mismos puntos de muestreo que en la EDAR Copero.

5.2.1. Entrada CENTA

Las muestras fueron tomadas en la entrada de la planta, el agua residual bruta procedente de la pequeña población de Carrión de los Céspedes. Los resultados obtenidos, se pueden ver en la tabla V.12. Se puede observar que son del mismo grado de magnitud que los obtenidos en aguas brutas de una población grande, e incluso mayores en algunos casos. Este efecto podría ser debido a que las aguas que llegan al CENTA son exclusivamente aguas urbanas, mientras que las que llegan al Copero, están mezcladas con aguas industriales del polígono "La Isla", que podrían contener menor cantidad de estos compuestos disueltos. Se observa un descenso de los valores, con mínimos en invierno y máximos en primavera, la disminución de estos valores podría venir provocada por la dilución de las muestras por las lluvias, no tan solo por la cantidad de agua que cae, sino también por el descenso de números de lavados de ropa en esos días. La toma de muestra tanto en otoño como en invierno, coincidió con períodos de lluvias débiles e intermitentes.

Tabla V.12. Resultados de fragancias de las muestras recogidas a la entrada del CENTA en las cuatro estaciones del año en ng/L.

Entrada CENTA	Fragancias				
	MA (ng/L)	MC (µg/L)	MX (ng/L)	G (µg/L)	T (ng/L)
Primavera	≤ 4,68	3,64 ± 0,58	1,31 ± 0,22	62,48 ± 8,75	5560,00 ± 945,2
Verano	≤ 4,68	1,48 ± 0,24	≤ 1,14	17,59 ± 2,46	1473,50 ± 250,50
Otoño	≤ 4,68	1,55 ± 0,25	12,71 ± 2,16	17,95 ± 2,51	734,65 ± 124,89
Invierno	≤ 4,68	0,82 ± 0,13	≤ 1,14	14,83 ± 2,08	61,28 ± 10,42
Valor medio anual	≤ 4,68	1,87	3,50	28,21	1957,36
Rango	≤ 4,68	0,82 - 3,64	≤ 1,14 - 12,71	14,83 - 62,48	61,28 - 5560

5.2.2. Salida del tratamiento primero de la planta del CENTA

Como se explico en el capítulo II, el tratamiento primario que se aplica en esta planta experimental, pertenece al proyecto SMART WETLAND. El proyecto combina e integra la depuración de aguas de pequeñas poblaciones con elementos tecnológicos, con el objetivo de mejorar la gestión y eficacia de los humedales artificiales.

El agua tras la salida del proceso primario (no convencional), se analizo obteniendo los resultados de la tabla V.13 donde se observa una disminución de fragancias en todos los caso, aunque no en la misma proporción, siendo aparentemente más acusada en verano.

Tabla V.13. Resultados de fragancias de las muestras recogidas a la salida del tratamiento primario del CENTA en las cuatro estaciones del año en ng/L.

CENTA salida de primario	Fragancias				
	MA (ng/L)	MC (ng/L)	MX (ng/L)	G (µg/L)	T (ng/L)
Primavera	≤ 4,68	622,00 ± 99,52	≤ 1,14	15,36 ± 2,15	1816,00 ± 308,72
Verano	≤ 4,68	258,00 ± 41,28	≤ 1,14	6,77 ± 0,95	936,00 ± 159,12
Otoño	≤ 4,68	967,90 ± 154,86	≤ 1,14	13,62 ± 1,91	298,16 ± 50,69
Invierno	≤ 4,68	806,63 ± 129,06	≤ 1,14	7,46 ± 1,04	53,05 ± 9,02
Valor medio anual	≤ 4,68	663,63	≤ 1,14	10,80	775,80
Rango	≤ 4,68	258,00 - 967,90	≤ 1,14	6,77 - 15,36	53,05 - 1816,00

5.2.3. Salida de tratamiento secundario de la planta del CENTA

Para este tratamiento y tal como se explico en el capítulo II, la planta utiliza el prototipo CEPESA que corresponde con un proceso de depuración secundaria, muy completa capaz de poder utilizarse en las Estaciones de Servicio, con el objetivo de depurar las aguas residuales de carácter doméstico generadas en las mismas. Los resultados obtenidos se pueden observar en la tabla V.14. Los datos de los compuestos siguen disminuyendo, incluso se ve un descenso más acusado en el almizcles cetona, en comparación con la salida

de la Copero. Los almizcles policíclicos se mantienen en rangos similares en ambas plantas de depuración.

Tabla V.14. Resultados de fragancias de las muestras recogidas a la salida del tratamiento secundario del CENTA en las cuatro estaciones del año en ng/L.

CENTA salida de secundario	Fragancias				
	MA (ng/L)	MC (ng/L)	MX (ng/L)	G (μ g/L)	T (ng/L)
Primavera	$\leq 4,68$	$194,00 \pm 31,04$	$\leq 1,14$	$6,13 \pm 0,86$	$402,40 \pm 68,41$
Verano	$\leq 4,68$	$73,89 \pm 11,82$	$\leq 1,14$	$4,31 \pm 0,60$	$238,68 \pm 40,58$
Otoño	$\leq 4,68$	$31,94 \pm 5,11$	$\leq 1,14$	$2,53 \pm 0,35$	$76,62 \pm 13,03$
Invierno	$\leq 4,68$	$313,30 \pm 50,13$	$\leq 1,14$	$4,14 \pm 0,58$	$39,23 \pm 6,67$
Valor medio anual	$\leq 4,68$	153,28	$\leq 1,14$	4,27	189,23
Rango	$\leq 4,68$	31,94 - 313,30	$\leq 1,14$	2,53 - 6,13	39,23 - 402,40

5.3. Resumen de resultados obtenidos con aguas residuales urbanas

Con objeto de resumir y comparar los resultados, a continuación se van a representar los diagramas de caja y bigote para todos los datos recogidos de aguas residuales en ambas EDAR, para cada compuesto, los datos utilizados se indican en la tabla V.15.

Tabla V.15. Valores relacionados con las gráficas de caja y bigote.

Datos Caja y bigote (ARU)	MC (ng/L)	MX (ng/L)	G (μ g/L)	T (ng/L)
Población	24	24	24	24
Mediana	595	0	10459	350
Mínimo	32	0	1891	37
Máximo	3637	15	62480	5560
1º Cuartil	271,75	0	4371,5	80,25
3º Cuartil	956,75	0,75	17032,25	990
Rango intercuartilico	685	0,75	12660,75	909,75
Outlet	3637	15; 13; 11; 8; 2;	62480	5560; 1891; 1816; 1726;

Las gráficas de caja y bigote para el MA y MX, no se representan al ser la mayoría de los valores por debajo del límite de detección. Para el resto de los compuestos se representa en dos gráficas separadas (figura V.4 y V.5)

debido a la variación de escala del galaxolide con el resto de los compuestos estudiados. Los valores que se consideran como outlet (Tabla V.15), para estos gráficos coinciden todas con los valores de primavera a la entrada y a la salida del tratamiento primario de las EDAR, tanto del Copero como del CENTA. Ello nos indica que los valores más altos de estos contaminantes emergentes se dan en primavera en la ciudad de Sevilla, en las entradas a las EDAR.

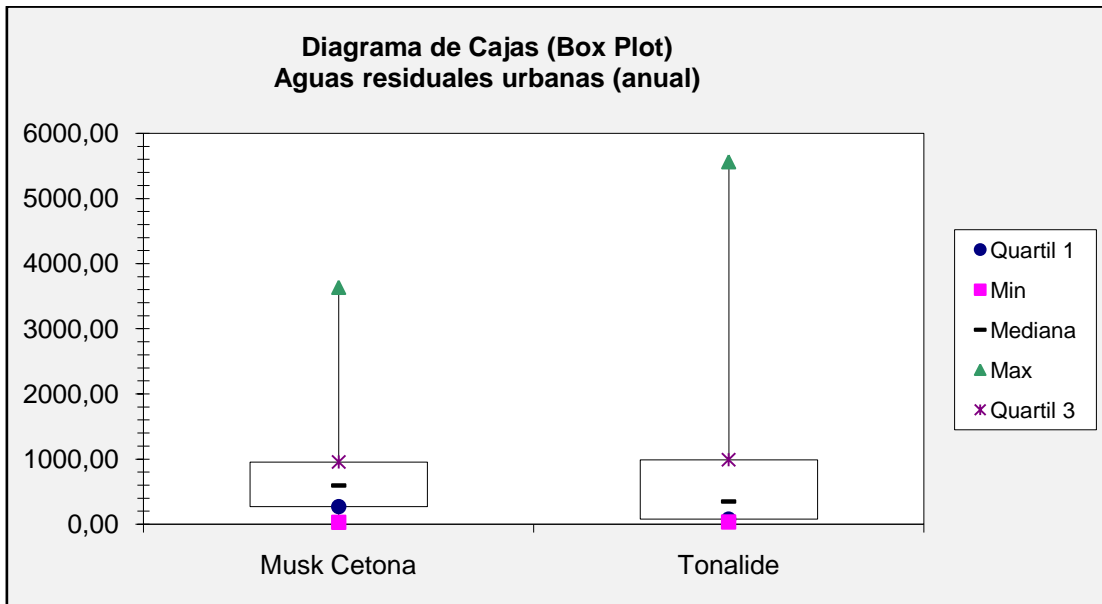


Figura V.4. Diagrama de cajas y bigotes para aguas residuales urbanas, para Almizcle Cetona y Tonalide, representando los datos anuales.

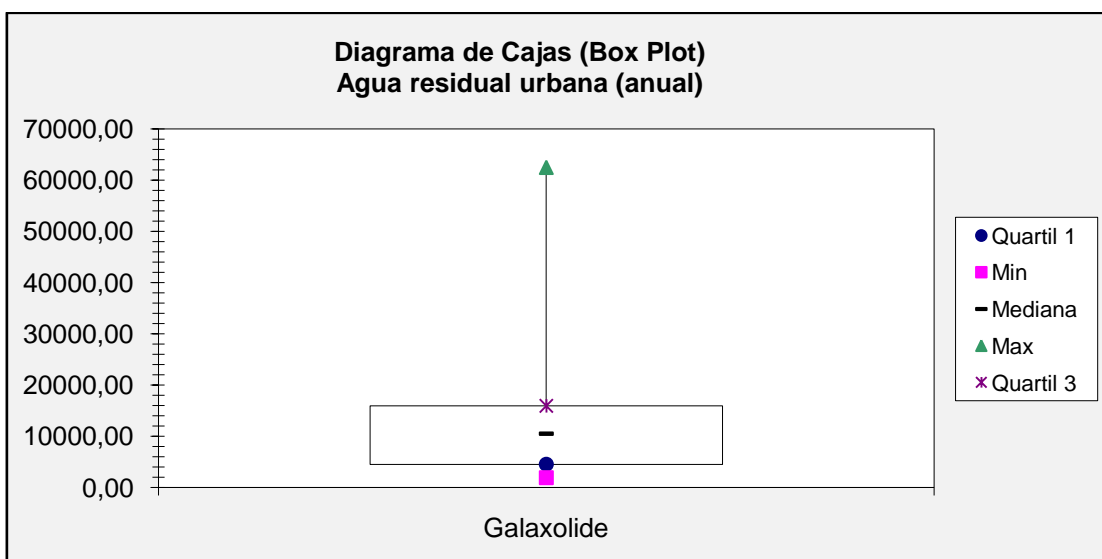


Figura V.5. Diagrama de cajas y bigotes para aguas residuales urbanas, para Galaxolide, representando los datos anuales.

5.4. Eficacia de las EDARs para la eliminación de las fragancias

En este apartado, se realiza una estimación de las eficacias de los tratamientos primarios y secundarios de depuración de aguas residuales para los compuestos objeto de estudio. Para ello, se ha tomado como el 100%, el valor de concentración a la entrada de agua residual a la EDAR, y se ha calculado el % de eliminación con el resultado de salida de cada tratamiento. En este cálculo no se considerara los almizcles ambreta y xileno, debido a que su aparición es puntual y prácticamente nula.

$$\% \text{ Eliminación} = 100 - ((\text{Concentración de salida} \times 100) / \text{Conc. agua bruta})$$

5.4.1. Eficacia de la EDAR Copero

Los resultados obtenidos para la eficacia en la salida del tratamiento primario se pueden ver en la tabla V.16. Donde observamos una baja eficacia para el almizcle cetona con un máximo de eficacia del 33%, y prácticamente constante en el tiempo. Los resultados para el Galaxolide son mínimos en invierno y otoño, consiguiendo llegar hasta un 49% en verano. Se podría pensar que el aumento de temperatura favorece su eliminación en este compuesto, mientras que en el tonalide se observa el efecto contrario.

Tabla V.16. Eficacia (%) del tratamiento primario en la EDAR Copero

% Eliminación	Fragancias		
	MC	G	T
Copero salida Primario			
Invierno	33	4	45
Otoño	29	5	76
Verano	19	49	19
Primavera	21	24	9

En los resultados del tratamiento secundario (tabla V.17), los porcentajes de elimina son superiores al 54% (excepto en primavera para MC), donde las condiciones más desfavorables se dan en primavera, seguidas del Invierno. Aunque se debería de tener en consideración que los valores de primavera

tenían concentraciones superiores. La eliminación para MC oscila entre 39 - 88%; para G entre 61 - 87%; y T entre 59 - 90 % respecto del agua bruta.

Tabla V.17. Eficacia (%) del tratamiento secundario en la EDAR Copero

% Eliminación	Fragancias		
	MC	G	T
Copero Salida Secundario			
Invierno	54	70	59
Otoño	85	87	90
Verano	88	73	81
Primavera	39	61	56

5.4.2. Eficacia de la EDAR CENTA

Los porcentajes de eliminación en el tratamiento primario del CENTA (tabla V.18), obtiene mejores resultados que los del proceso primario de la EDAR Copero. Llegando a obtener valores de 83% para el MC; 76% para G y 67% para T.

Tabla V.18. Eficacia (%) del tratamiento primario en la EDAR CENTA

% Eliminación	Fragancias		
	MC	G	T
CENTA salida Primario			
Invierno	2	50	13
Otoño	37	24	59
Verano	83	62	36
Primavera	83	76	67

Estos porcentajes se ven mejorados al pasar por el tratamiento secundario (tabla V.19), obteniendo valores superiores al 84% para todas las fragancias, excepto en invierno, que lo % son inferiores, esto nos indicaría una mejora de los valores con el aumento de las temperaturas.

Tabla V.19. Eficacia (%) del tratamiento secundario en la EDAR CENTA

% Eliminación	Fragancias		
	MC	G	T
CENTA salida Secundario			
Invierno	62	72	36

% Eliminación	Fragancias		
	MC	G	T
CENTA salida Secundario			
Otoño	98	86	90
Verano	95	76	84
Primavera	95	90	93

6. Estudio comparativo con otros trabajos de investigación

Se ha realizado un estudio comparativo de los resultados obtenidos en esta tesis con los de otros trabajos realizados en España y en otros países, como se puede ver en la tabla V.20. Se llega a las conclusiones siguientes:

- Las muestras de agua de río, tienen valores superiores a otros países, pero muy similares a las obtenidas en otras zonas de España.
- Los resultados obtenidos del agua de mar, procedente de la costa de Huelva son algo superiores a los obtenidos en el mar del Norte, para todas las fragancias.
- Los resultados obtenidos para los efluentes de aguas residuales urbanas tienen más diferencias en función de la fragancia, como se indica a continuación:

El Galaxolide se encuentran en el mismo rango de concentración en todos los países, excepto en USA que presenta el valor más bajo.

El Tonalide presenta valores similares a los de los otros países, obteniéndose el valor más bajo en USA y los más altos en Alemania y UK.

Almizcle Xileno, en este estudio para el efluente no se ha detectado, esto también ocurre en otros países. Se destacaría que es superior en la parte norte y centro de España, comparables con UK y Alemania.

Almizcle Cetona, es similar en toda España, se obtuvieron los valores más altos en los estudios de Alemania y muy bajos en los efluentes de USA, Australia, Canadá y Suecia.

- Los resultados de los afluentes de aguas residuales urbanas en España, obtienen valores superiores para el galaxolide, tonalide y almizcle cetona. Aunque difieren poco de los resultados obtenidos en Texas.

Tabla V.20. Comparación con los valores obtenidos en otros países

Procedencia	Tipo de muestra	HCHB (ng/L)	AHTN (ng/L)	MX (ng/L)	MK (ng/L)	Referencia
Alemania	Agua de río	36-152	24-88	*	2-10	Winkler et al., 1998
Japón	Agua de río	0,7-100	*	4,1	9,9	Yun et al., 1994
UK	Agua de río	*	*	2	3-7	Simonich et al., 2002
España	Agua de río	44-1861	12-194	10,0-23	15-40	Gómez et al, 2009
España	Agua de río	6 - 1028	≤ 0,04 - 112	≤ 1 - 34	≤ 2 - 91	Esta Tesis 2016
España	Agua de mar	2 - 10	≤ 0,04 - 19	≤ 1 - 23	≤ 2 - 6	Esta Tesis 2016
Mar del norte	Agua mar	0,09-0,088	0,09-0,94	*	*	Bester et al.,1998
Alemania	Efluente EDAR	600-2000	800-2400	30-310	220-1300	Eschke et al., 1994
Holanda	Efluente EDAR	1600	700	*	*	Artola, 2002
Austria	Efluente EDAR	*	*	<10	38-53	Hohenblum et al.,2000
UK	Efluente EDAR	1000-4600	600-2700	40-200	10-170	Simonich et al., 2002
USA	Efluente EDAR	56,9	34	1,1	27,4	Osemwengic et al.,2004
China	Efluente EDAR	297-2300	86-717	*	80-743	Zeng et al.,2005; 2007
España	Efluente EDAR	1259-8697	156-981	59-203	34-218	Gómez et al, 2009
España	Efluente EDAR	*	*	25-36	140-410	Martínez et al, 2012
Canadá y Suecia	Efluente EDAR	157-1300	42-520	<1	<1	Ricking et al, 2003
España	Efluente EDAR	1890 - 6130	37 - 829	≤ 1,14	312 - 429	Esta Tesis 2016
Texas	Afluente EDAR	4772-13399	509-2337	ND	ND-812	Chase et al., 2012
Alemania	Afluente EDAR	30 - 100	30 - 100	*	*	DsiKowitzky et al, 2004
Alemania	Afluente EDAR	1900	580	*	*	Bester, K. (2004)
España	Afluente EDAR	7030 - 62480	61 - 5560	≤ 1 - 15	525 - 3640	Esta Tesis 2016

* Dato no conocido

7. Conclusiones de los resultados

El almizcle ambreta, no fue detectado en ninguna muestra, esto es debido a que fue prohibido en Europa en 1995, puesto que está confirmada su actuación como foto-alérgeno potente y su inclusión en los productos cosméticos puede representar un riesgo para la salud humana. Más tarde (1998) también se prohibió el uso de las almizcles moskene y tibetene debido a la toxicidad que podían generar a largo plazo, estos dos últimos compuesto no fueron seleccionados en esta tesis.

El almizcle cetona, se encuentra en la mayoría de las muestras analizadas, en concentraciones más alta en las aguas residuales urbanas y en el río Guadaira en Bellavista, teniendo valores muy bajos en el resto de muestreos de río y mar.

Las aguas de mar, son las menos contaminadas por las fragancias, observándose en valores muy bajos y constantes durante el año.

El almizcle xileno aparece en algunos muestreos de forma intermitente y en concentraciones muy bajas. Puede ser debido a que en 2008, bajo la autoridad del Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de Sustancias Químicas (REACH), el almizcle xileno fue clasificado como una sustancia de gran preocupación, muy bioacumulables y designado como muy persistente.

Los compuestos Galaxolide y Tonalide, son los compuestos mayoritarios en todas las muestras, teniendo valores de $\mu\text{g/L}$ en las muestras tomadas en las plantas de depuración de aguas residuales, en todas sus muestras. Aunque el Galaxolide destaca teniendo las concentraciones más altas, debido a que tiene un volumen de producción de 1000 a 5000 toneladas/año en Europa, superior al resto de las otras fragancias.

Se observa que todas las fragancias de las aguas residuales urbanas disminuyen su concentración a su paso por los procesos de depuración. Los porcentajes de eliminación son mayores en el CENTA que en el Copero, al utilizar aquellas tecnologías más avanzadas que se están experimentando en

dicha planta. Estos procesos también se ven favorecido por el aumento de temperatura ambiental para una eliminación más eficaz.

8. Otros contaminantes emergentes detectados / identificados en las muestras analizadas

Posibles compuestos que se han detectado e identificados en las muestras de aguas analizadas y que se podrían analizar por este mismo método de análisis, tras las correspondientes optimizaciones y validaciones, se relacionan en la tabla V.21. No significa que no haya más compuestos, sino que adquiriendo en Full Scan y en estas condiciones de análisis, solo se detectan los que están en mayor concentración, más volátiles o más afines a quedarse retenido en este tipo de fibra.

En este apartado se ha llevado a cabo en Full Scan realizando un barrido de masas entre: 40-400 uma. Los picos encontrados en el cromatograma se llevaron para su identificación a la librería espectral NIST, con una similitud superior al 700 sobre 1000 (70%), tanto en la comparación del espectro con la biblioteca, denominado "R. Match", como en la comparación del espectro de la librería con el espectro de masas obtenido experimentalmente en el cromatograma, denominado "F. Match". Al no tener patrones no se puede afirmar que los compuestos son inequívocamente los que dice la librería NIST, aunque sí con una probabilidad alta.

Tabla V.21. Compuestos identificados con la librería NIST

Tr (min)	COMPUESTOS	EDAR		Río GUADAIRA		Río GUADALQUIVIR		MAR
		COPERO	CENTA	ALCALA	BELLAVISTA	CORIA	SEVILLA	HUELVA
1.418	Carbon dioxide		X		X			
1.605	Cyclohexane				X			
1.761	dl-Alanyl-l-alanine				X			
1.780	Acetone		X	X	X	X	X	X
1.804	Acetic acid, 2-propenyl ester	X			X			
1.804	2-Heptanone, 7,7,7-trichloro-		X		X			
1.893	1,2,4,5-Tetroxane, 3,3,6,6-tetramethyl-	X			X			
1.895	Formic acid, chloro-, (3,4,4-trimethyl-1		X		X			

ANÁLISIS DE FRAGANCIAS EN AGUAS MEDIANTE TÉCNICAS AVANZADAS DE CROMATOGRFÍA

Tr (min)	COMPUESTOS	EDAR		Río GUADAIRA		Río GUADALQUIVIR		MAR
		COPERO	CENTA	ALCALA	BELLAVISTA	CORIA	SEVILLA	HUELVA
1.918	1,3-Dioxane-4,6-dione, 2,2-dimethyl-	X			X			
1.981	Propanamide, N-methyl-2-amino-	X						
2.026	dl-Alanyl-dl-.alpha.-amino-n-butyric aci		X					
2.978	2-Pentanone, 4-amino-4-methyl-				X			
3.144	Butanenitrile, 2,3-dioxo-, dioxime, o,o'				X			
4.060	o-Methylisourea hydrogen sulfate	X						
4.148	Isobutane				X			
4.996	Butanimidamide				X			
5.227	Carboisopropoxy diethylamino sulfide				X			
5.548	Hydroxylamine, O-decyl-			X				
5.963	Heptane, 1-(2-propenyloxy)-							X
6.181	3-Amino-2-oxazolidinone						X	
6.241	1-Octadecanamine, N-methyl-				X			
6.261	Pentanal, 2,4-dimethyl-			X				
6.327	1-Propanesulfonyl chloride				X			
7.032	Cyclotetrasiloxane, octamethyl-		X	X		X		
7.447	Acetic acid			X			X	
7.966	Heptadecane					X		
8.266	Phosphoric acid, trimethyl ester				X	X		
8.327	3-Octanol, 3,7-dimethyl-, (-+/-)-		X					
8.408	Ethanol, 2-butoxy-		X					
8.432	2-(2',4',4',6',6',8',8'-Heptamethyltetra			X				
8.644	7-Octen-2-ol, 2,6-dimethyl-	X	X					
8.731	3-Isopropoxy-1,1,1,7,7,7-hexamethyl-3,5,		X	X	X			
8.759	Cycloheptasiloxane, tetradecamethyl-	X	X					
8.805	1-Hexanol, 2-ethyl-		X					
8.813	Octasiloxane, 1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,		X					
8.883	Tetrasiloxane, 1,1,3,3,5,5,7,7-octamethyl		X					
9.214	1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-		X					
9.277	Pentadecane			X	X			X
9.325	Cyclopropane, pentyl-		X					
9.327	Silane, dimethyl(dimethyl(dimethyl(2-iso	X						
9.397	Cyclohexanemethanol, .alpha.,.alpha.,4-t		X					
9.434	Bicyclo[2.2.1]heptan-2-ol, 1,7,7-trimethyl		X					
9.516	Hexadecanal, 2-methyl-		X					
9.521	3-Cyclohexen-1-ol, 1-methyl-4-(1-methyle	X						
9.652	Cyclohexanol, 2-(1,1-dimethylethyl)-		X					
9.703	Eicosane			X				
9.938	Silane, [[4-[1,2-bis(trimethylsilyl)oxy	X	X		X			
9.962	Cyclohexanol, 5-methyl-2-(1-methylethyl)	X	X					
10.054	N-[2-(Dimethylamino)ethyl]-2-(4-pyridiny		X					
10.074	1-Dodecanamine, N,N-dimethyl-		X					

CAPTULO V: RESULTADOS MUESTRAS REALS

Tr (min)	COMPUESTOS	EDAR		Río GUADAIRA		Río GUADALQUIVIR		MAR
		COPERO	CENTA	ALCALA	BELLAVISTA	CORIA	SEVILLA	HUELVA
10.081	Silane, trichlorodocosyl-	X	X					
10.155	Hexatriacontane		X					
10.184	Dothiepin		X					
10.227	Pyridine, 2-(methylthio)-		X					
10.228	Doxepin		X					
10.290	Hexanoic acid			X		X		
10.309	3(N,N-Dimethylmyristylammonio)propanesul	X						
10.344	1-Hexadecanamine, N,N-dimethyl-	X						
10.353	Dodecanal		X		X			
10.390	1-Pentadecanamine, N,N-dimethyl-		X					
10.447	Propanoic acid, 2-methyl-, 3-hydroxy-2,4		X	X	X	X	X	X
10.465	1-Octadecanamine, N,N-dimethyl-	X						
10.482	3-Cyclohexene-1-methanol, .alpha.,.alpha	X	X					
10.603	1-Undecanamine, N,N-dimethyl-	X						
10.739	2,4,6(1H,3H,5H)-Pyrimidinetríone, 1-[2-(X						
10.777	2,2,6,7-Tetramethyl-10-oxatricyclo[4.3.0				X			
10.884	Oxime-, methoxy-phenyl-__		X		X			X
10.900	Cyclohexanol, 3-(3,3-dimethylbutyl)-		X					
10.901	11-Tridecenyl propionate		X					
10.954	6-Octen-1-ol, 3,7-dimethyl-, (R)-		X					
11.057	Benzeneethanol, .alpha.,.alpha.-dimethyl		X					
11.089	1-Decanol, 2-ethyl-		X					
11.222	Heptasiloxane, 1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11		X		X			
11.224	Dodecyl acrylate							X
11.237	Tetradecyl trifluoroacetate					X		
11.238	1,3,5,7,9-Pentaethylbicyclo[5.3.1]pentas	X						
11.245	Heptafluorobutyric acid,n-tridecyl ester						X	
11.282	2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimethyl-, (Z)-		X					
11.435	Benzene, (1-butylheptyl)-		X					
11.509	Tetracosane			X		X	X	X
11.732	5,9-Undecadien-2-one, 6,10-dimethyl-, (Z)				X			
11.733	.alpha. Isomethyl ionone	X	X					
11.771	1-Undecanol		X					
11.881	Methoxyacetic acid, dodecyl ester	X						
11.895	Oxirane, [(dodecyloxy)methyl]-		X					
11.982	1-Hexadecanol, 2-methyl-						X	
12.066	8-Hydroxy-2-octanone	X						
12.076	1-Octanol, 2,7-dimethyl-		X					
12.089	Propanoic acid, 2-methyl-, 2,2-dimethyl-	X	X		X		X	
12.146	Octanoic Acid			X				
12.299	Tetradecanal				X			
12.304	Benzene, (1-pentylheptyl)-		X					

ANÁLISIS DE FRAGANCIAS EN AGUAS MEDIANTE TÉCNICAS AVANZADAS DE CROMATOGRFÍA

Tr (min)	COMPUESTOS	EDAR		Río GUADAIRA		Río GUADALQUIVIR		MAR
		COPERO	CENTA	ALCALA	BELLAVISTA	CORIA	SEVILLA	HUELVA
12.376	Benzene, (1-butyloctyl)-		X					
12.504	Hexadecane, 1-chloro-		X					
12.560	9-Octadecen-12-ynoic acid, methyl ester		X					
12.570	3-Buten-2-one, 4-(2,6,6-trimethyl-1-cycl		X					
12.670	1-Dodecanol	X	X					
12.748	n-Tridecan-1-ol				X			
12.894	Acetate, (2,4a,5,8a-tetramethyl-1,2,3,4,		X					
13.047	2-Methyl-1-undecanol		X					
13.082	Oleic Acid			X		X	X	
13.084	Nonanoic acid			X			X	X
13.203	Diphenyl ether	X	X					
13.279	Nonadecane			X		X	X	X
13.378	Isopropyl Myristate				X			
13.437	2,5,5,8a-Tetramethyl-1,2,3,5,6,7,8,8a-oc		X					
13.501	1H-Indene, 2,3-dihydro-1,1,3-trimethyl-3			X	X		X	
13.553	6S-2,3,8,8-Tetramethyltricyclo[5.2.2.0(1		X					
13.663	(7a-Isopropenyl-4,5-dimethyloctahydroind	X	X					
13.733	Ethanol, 2-(dodecyloxy)-	X	X	X		X	X	X
13.998	n-Decanoic acid			X				X
14.144	2,6,10-Dodecatrien-1-ol, 3,7,11-trimethy			X				
14.292	trans-Z-.alpha.-Bisabolene epoxide		X					
14.292	Tricyclo[4.3.0.0(7,9)]nonane, 2,2,5,5,8,		X					
14.299	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-	X	X	X	X	X	X	X
14.570	Cyclotetradecane	X	X					
14.580	1-Hexadecanol		X		X	X	X	
14.705	Doconexent			X				
14.928	2-Hexyl-1-octanol		X					
14.943	Naphthalene, 2-methoxy-		X					
15.006	Octacosane					X		
15.265	Octadecanoic acid, methyl ester			X				
15.604	1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl							X
15.697	Cyclopentaneacetic acid, 3-oxo-2-pentyl-	X						
15.804	Phenol, 2,5-bis(1,1-dimethylethyl)-	X	X					
15.941	Benzophenone		X	X	X	X	X	X
15.985	Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-	X	X					
16.316	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-meth		X	X	X	X	X	X
16.339	Octanal, 2-(phenylmethylene)-		X					
16.350	1-Hexacosene				X		X	
16.370	Hexadecen-1-ol, trans-9-	X	X	X				X
16.635	9-Hexadecen-1-ol, (Z)-	X						
16.663	Triethylene glycol monododecyl ether			X				
16.822	Oxirane, tetradecyl-			X				

Tr (min)	COMPUESTOS	EDAR		Río GUADAIRA		Río GUADALQUIVIR		MAR
		COPERO	CENTA	ALCALA	BELLAVISTA	CORIA	SEVILLA	HUELVA
17.038	Ethanol, 2-(octadecyloxy)-	X	X					
17.263	Dodecanoic acid		X					
17.471	1H-Indole, 3-methyl-		X					
17.534	9-Phenyl-n-nonanol		X					
17.651	Tetradecanoic acid			X				
17.796	Dibutyl phthalate	X	X	X	X	X	X	X
17.822	Phthalic acid, isobutyl octyl ester	X						
18.318	7,9-Di-tert-butyl-1-oxaspiro(4,5)deca-6,					X	X	X
18.325	9-Octadecen-1-ol, (E)-	X						
18.572	Diethylene glycol monododecyl ether	X	X					
19.266	1,2-Benzenedicarboxylic acid, butyl 2-et				X			
19.292	Phthalic acid, hex-2-yn-4-yl isobutyl es	X						
20.375	n-Hexadecanoic acid	X	X	X	X	X	X	X
20.820	Hexadecenoic acid, Z-11-			X				

Se pueden observar los datos del resumen obtenido en las figuras V.6 a la V.12, correspondientes a los cromatogramas.

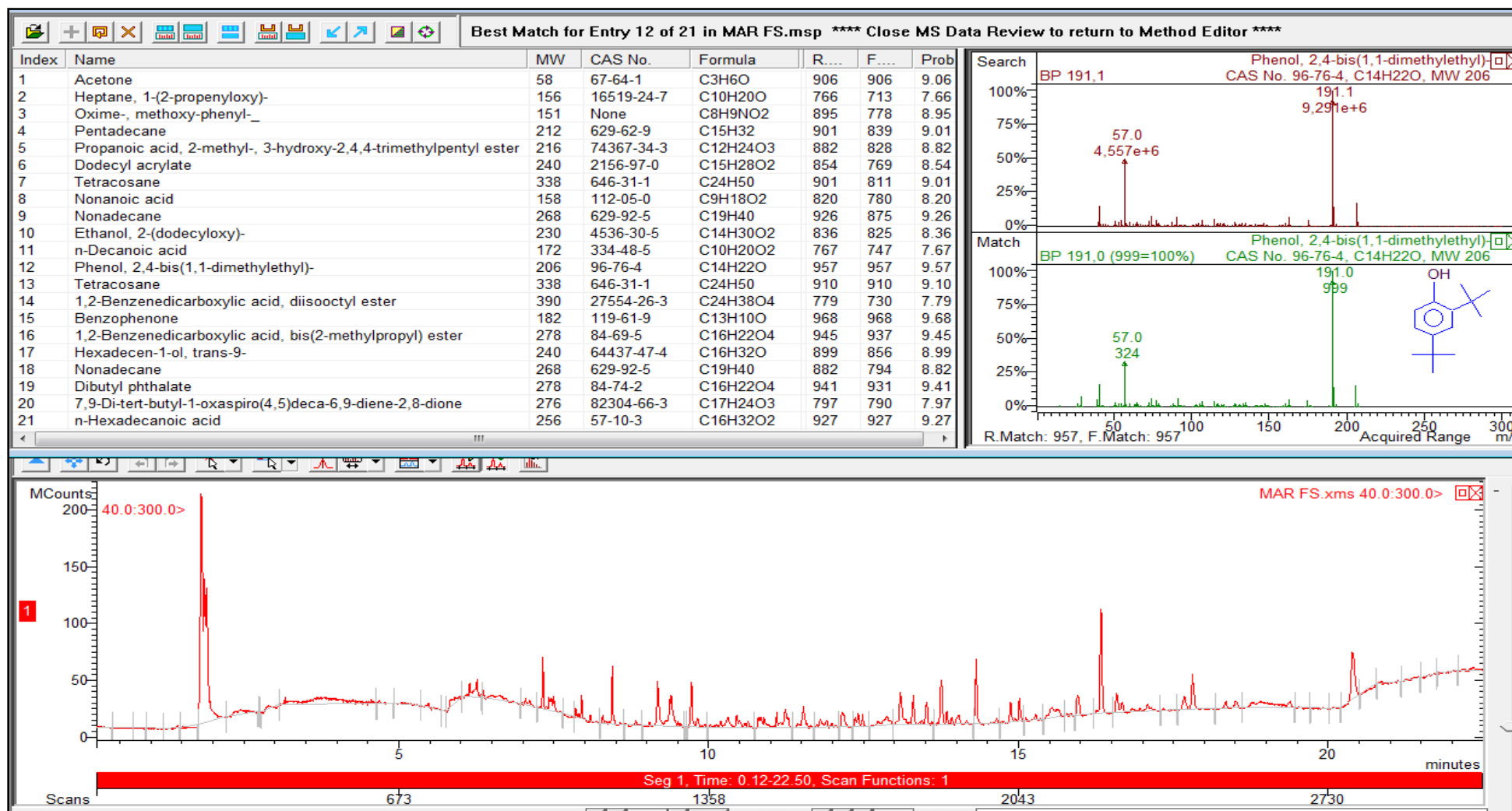


Figura V.6. Cromatograma de agua de mar en Full Scan, identificado en la NIST

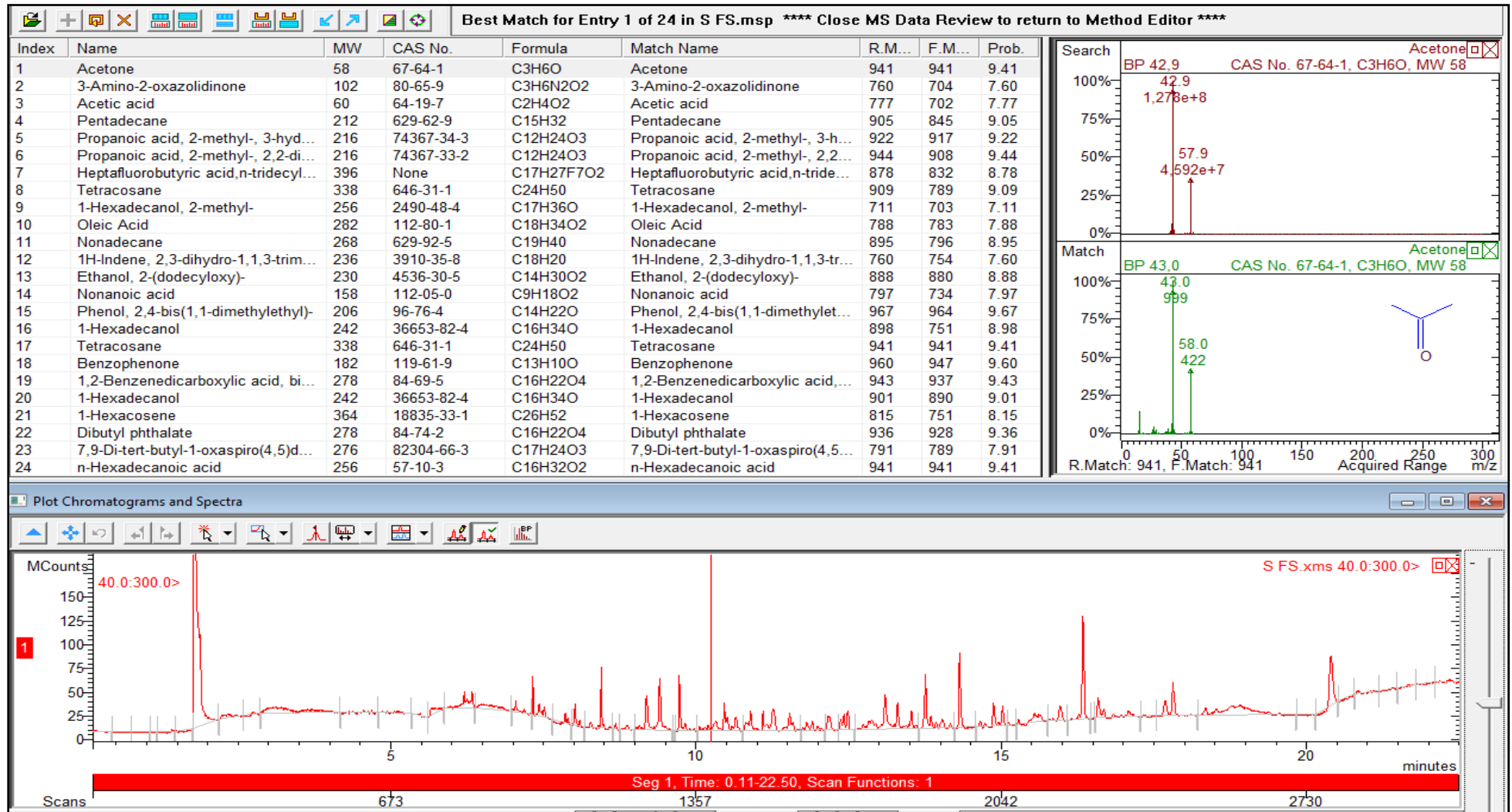


Figura V.7. Cromatograma de Sevilla, dársena del río Guadalquivir, en Full Scan, identificado en la NIST

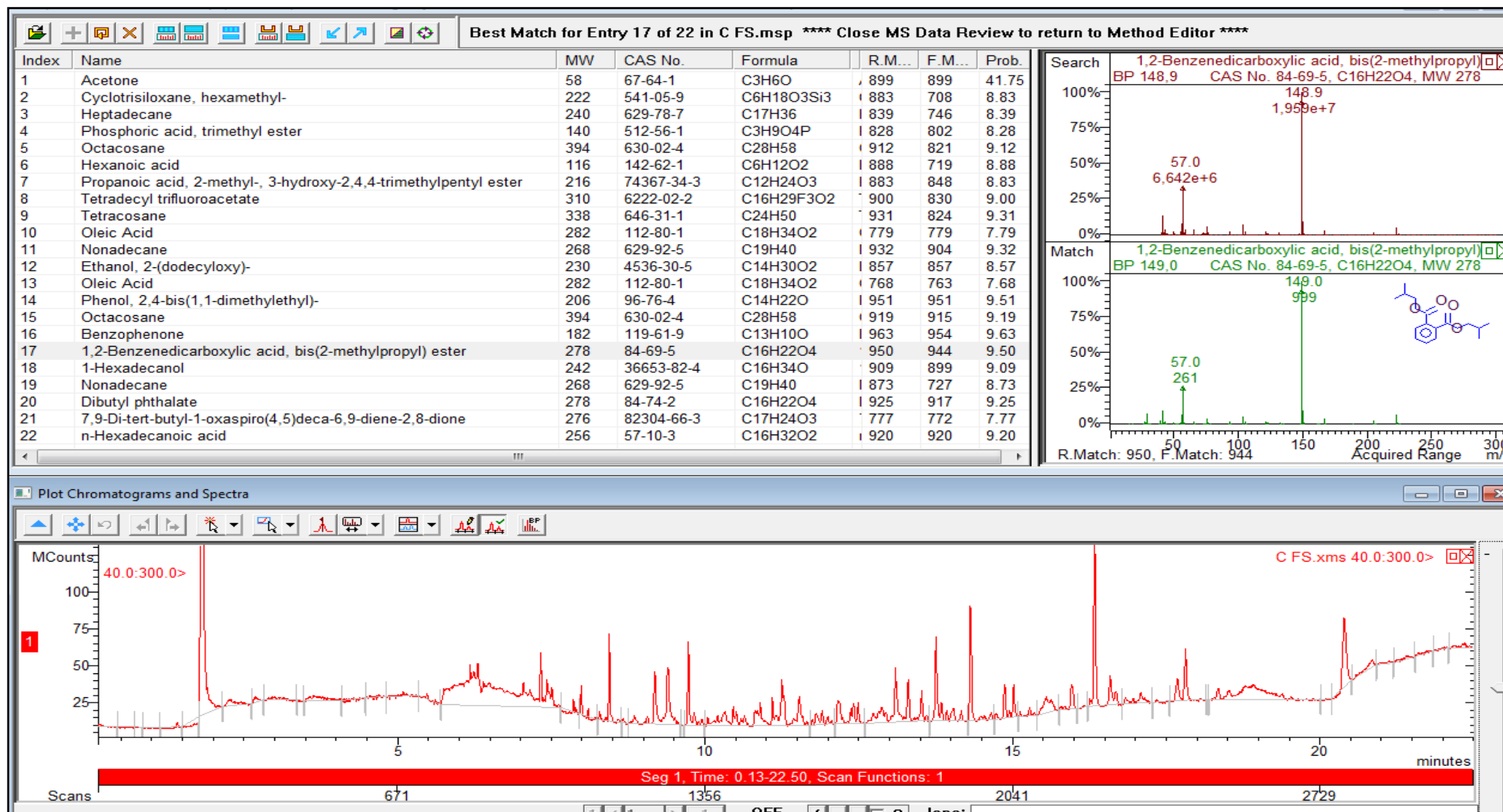


Figura V.8. Cromatograma del cauce del río Guadalquivir (Coria) en Full Scan, identificado en la NIST

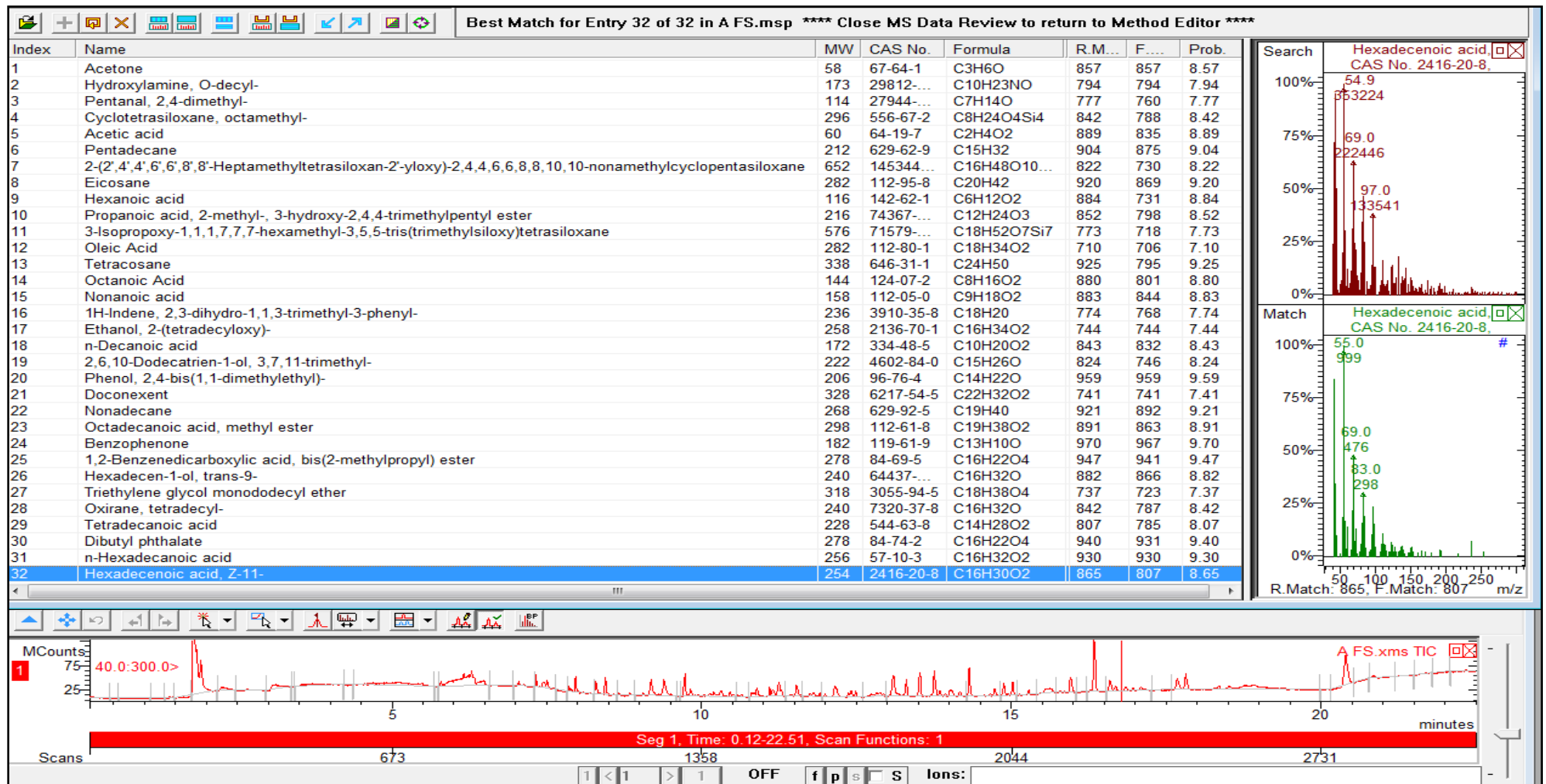


Figura V.9. Cromatograma del cauce del río Guadaira (Alcalá de Guadaira) en Full Scan, identificado en la NIST

ANÁLISIS DE FRAGANCIAS EN AGUAS MEDIANTE TÉCNICAS AVANZADAS DE CROMATOGRFÍA

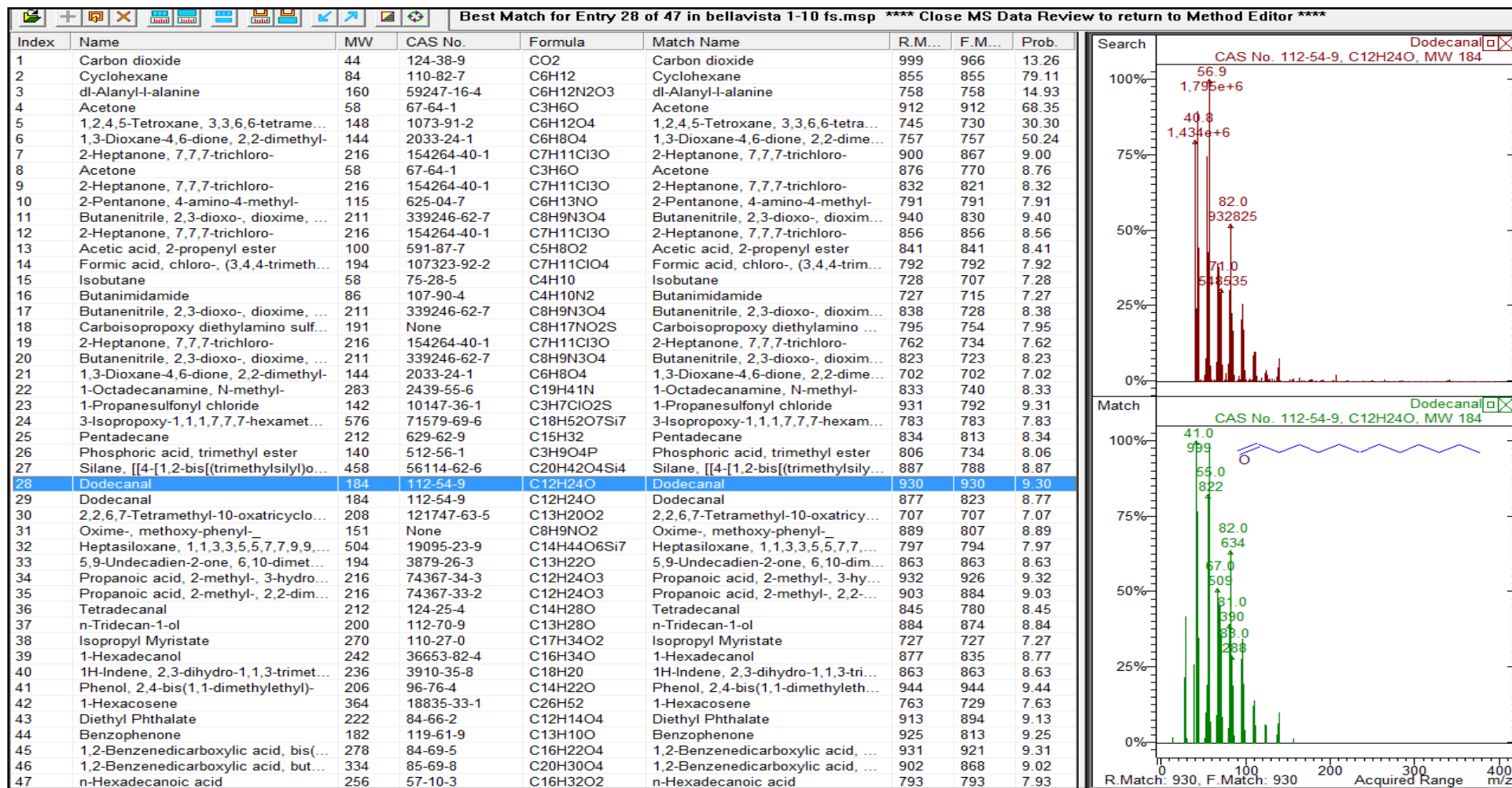


Figura V.10. Cromatograma del cauce del río Guadaira (Bellavista) en Full Scan, identificado en la NIST

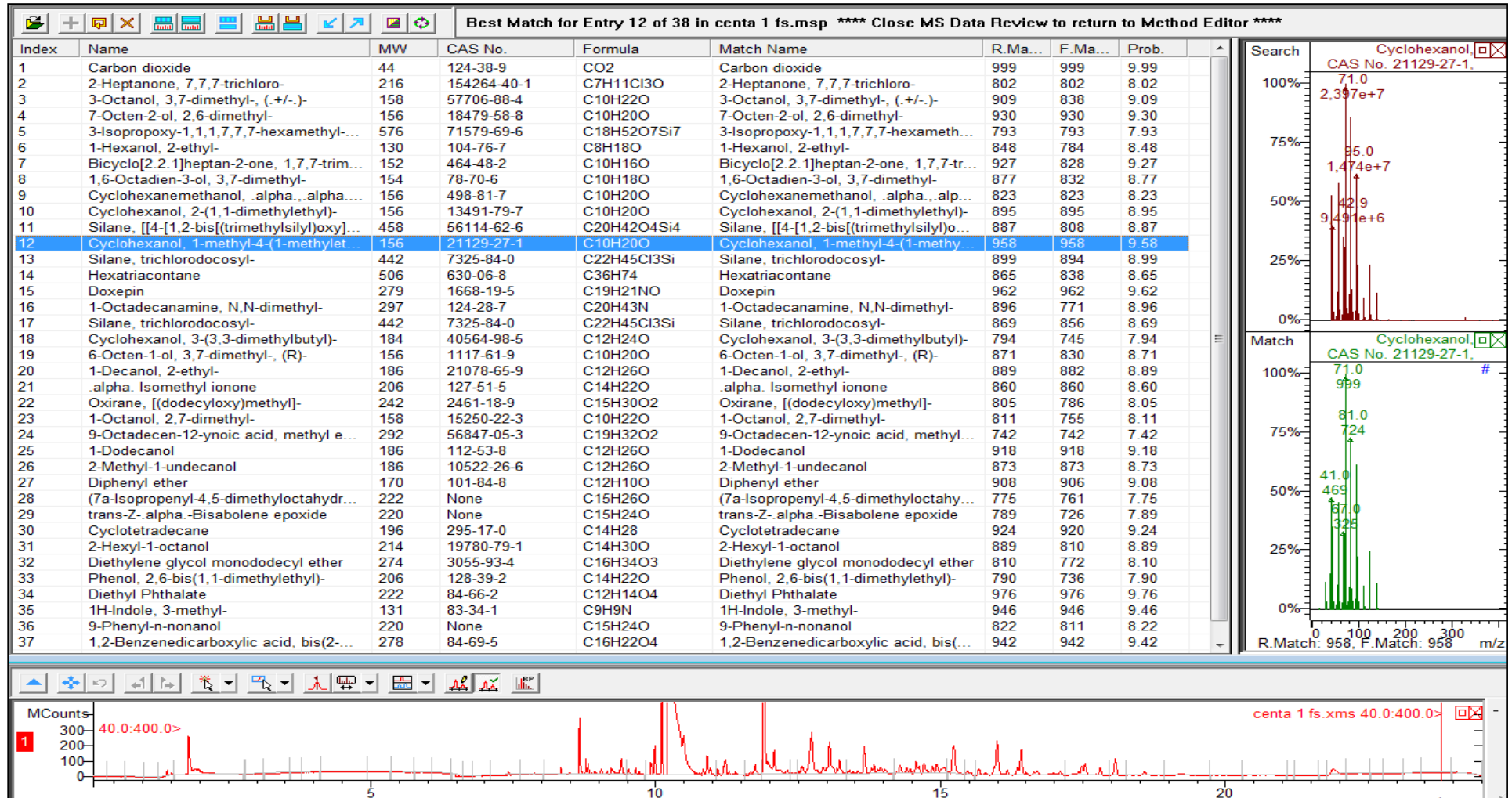


Figura V.11. Cromatograma de agua residual del CENTA (ejemplo: salida del tratamiento primario) en Full Scan, identificado en la NIST

ANÁLISIS DE FRAGANCIAS EN AGUAS MEDIANTE TÉCNICAS AVANZADAS DE CROMATOGRFÍA

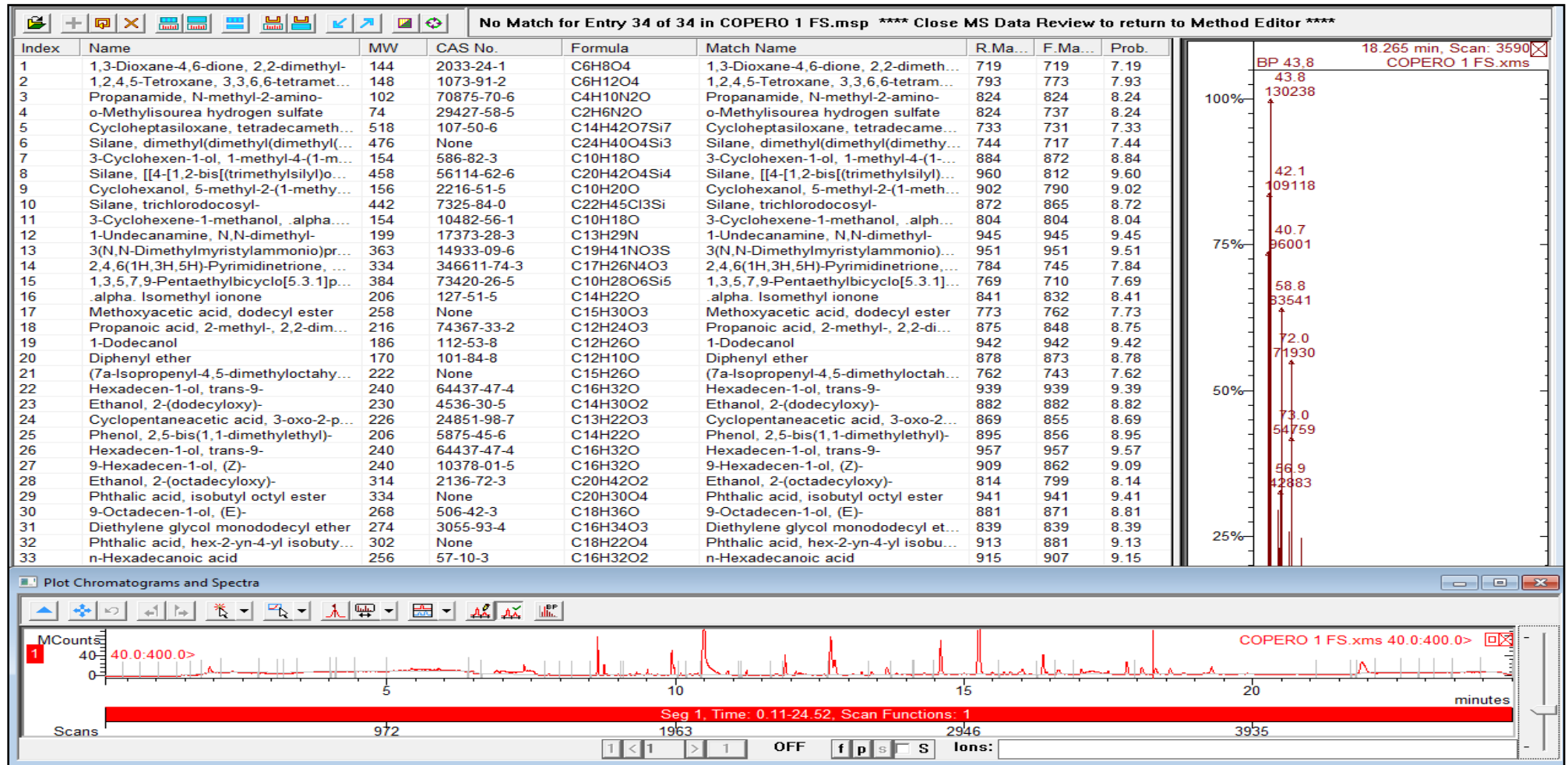


Figura V.12. Cromatograma de agua residual del Copero (ejemplo: salida del tratamiento primario) en Full Scan, identificado en la NIST

Se destacaría de estos resultados las siguientes observaciones:

- Hay tres compuestos presentes en todas las muestras, al mismo tiempo de retención, como son: 2,4-di-terc-butilfenol; Ftalato de dibutilo y ácido n-Hexadecanoico.

El 2,4-di-terc-butilfenol es una materia prima para antioxidantes de fosfito. Los antioxidantes se utilizan principalmente en la fabricación de poliolefinas; Se usa también como un intermedio para la preparación de protectores solares y en la fabricación de productos farmacéuticos y perfumes.

El ftalato de dibutilo también conocido como DBP (Dibutilftalato), es un compuesto orgánico usado en la industria como plastificante. También se utiliza como un aditivo en adhesivos, tintas para impresoras y en productos cosméticos.

El ácido n-Hexadecanoico ó palmítico es el principal ácido graso saturado de la dieta, constituyendo aproximadamente un 60 % de los mismos. Es el más abundante en las carnes (detrás del ácido oleico, que es monoinsaturado) y grasas lácteas (mantequilla, queso y nata) y en los aceites vegetales como el aceite de coco y el aceite de palma.

- Un compuesto presente en todas las muestras menos en el río Guadaira a su paso por Bellavista, el es 2- (dodeciloxi) etanol, usado como emulsificante y tensoactivo en la industria cosmética (agencia española de medicamentos y productos sanitarios).

- Cuatro compuestos coinciden en todos los muestreos menos en las muestras tomadas en la EDAR Copero, como son: acetona, ácido 2-metil- , éster de 3-hidroxi-2, 4,4-trimetilpentilo propanoico; Benzofenona y diisooctil ftalato.

La acetona sintetizada se usa en la fabricación de plásticos, fibras, medicamentos y otros productos químicos, así como disolvente de otras sustancias químicas. La acetona es un disolvente de uso común en los laboratorios de cromatografía.

El ácido 2-metil-, éster de 3-hidroxi-2,4,4-trimetilpentilo propanoico, o también conocido como Texanol B, son alcoholes de éster y se utilizan como agentes de coalescencia para pinturas de látex.

La Benzofenona se puede utilizar como filtro para las radiaciones UV, en compuestos tales como tintas, imágenes, y recubrimientos claros en la impresión de la industria. Benzofenona evita la radiación ultravioleta (UV) para que la luz no dañe olores y colores en productos como perfumes y jabones. También se puede añadir a los envases de plástico como un bloqueador de UV para evitar la foto-degradación de los polímeros de embalaje o su contenido. Su uso permite a los fabricantes para empaquetar el producto en vidrio transparente o de plástico. Sin ella, sería necesario envases opacos u oscuros.

El diisooctil ftalato (DIOP), también procede de la industria del plástico: envases, juguetes, cosmética, etc.

- El tetracosano y el Nonadecano, coinciden en cuatro puntos de muestreos, excepto en las EDAR y en Bellavista, son compuestos procedentes de combustibles, como la gasolinas y lubricantes.
- Los compuestos del Copero, coinciden en su mayoría con los del CENTA, ambos son muestras procedentes de la EDAR.
- Los compuesto identificados en Río Guadaira a su paso por Bellavista tiene bastantes compuestos coincidentes con los de las EDAR, la apariencia de la muestra al tomarla era bastante sucia. El Guadaira recibe el efluente de la EDAR Copero
- La mayoría de los compuestos identificados en Coria, también son detectados en Sevilla, ambos procedentes del Río Guadalquivir (dársena).
- Los compuestos encontrados en agua de mar son más similares a los obtenidos en los ríos, que en las EDARs.
- Se observan mayor número de compuestos identificados en el CENTA, seguido por el Copero y Bellavistas en partes iguales, siendo inferiores en el resto de puntos de muestreo.

- Para evaluar la peligrosidad de estos compuestos, se comprueba en la tabla V.21, si están en la relación de sustancias presentes en el Anexo XIV y/o XVII de la versión consolidada del REACH. Se han tenido en cuenta todas las modificaciones al Reglamento hasta el 13 de mayo de 2013. También se tuvo en cuenta el Reglamento (UE) nº 895/2014 que ha modificado el anexo XIV de REACH, por el que se establece la lista de sustancias sujetas autorización en el cual, se han añadido 9 nuevas sustancias a este Anexo. El Anexo XVII, trata sobre las restricciones a la fabricación, comercialización y uso de determinadas sustancias, mezclas y artículos peligrosos. En el caso de las sustancias incorporadas en el presente anexo como consecuencia de las restricciones adoptadas en el marco de la Directiva 76/769/CEE (entradas 1 a 58), las restricciones no se aplicarán al almacenamiento, la conservación, el tratamiento, el envasado en recipientes ni el trasvasado de un recipiente a otro de dichas sustancias destinadas a la exportación, salvo que su fabricación esté prohibida. Esto se aplicaría a 4 de las 5 sustancias encontradas en el Reglamento (Tabla V.22). Estas 5 sustancias son las que se encuentran indicadas en el REACH, de todos los compuestos incluidos en la tabla V.21.

Tabla V.22. Sustancias presentes en el Anexo XIV y/o XVII del REACH.

Nº Entrada	Nº CAS	Sustancia	Nº Clasificación	Nº CE	Propiedades intrínsecas contempladas en el art. 57
1	81-15-2	5-terc-butil-2,4,6-trinitrom-xileno (Almizcle de xileno)		201-329-4	Muy persistente y muy bioacumulable
6	84-74-2	ftalato de dibutilo (DBP)	607-318-00-4	201-557-4	Tóxico para la reproducción (categoría 1B)
7	84-69-5	Ftalato de diisobutilo (DIBP)	607-623-00-2201-553-2	201-553-2	Tóxico para la reproducción (categoría 1B)
57	110-82-7	Ciclohexano		203-806-2	
	203-450-8	butano [contiene $\geq 0,1$ % butadieno]	601-004-01-8	20-857-2	

- Teniendo en cuenta la Directiva Marco de Agua (de cual ya se hablo en el capítulo I) se ha comprobado que los compuestos que constituyen la tabla V.21. no se encuentran presentes en la Lista de sustancias prioritarias de la

normativa de calidad ambiental (tabla I.3), ni tampoco en la lista de observación de sustancias a efectos de seguimiento (tabla I.4).

- También se comprobó con la lista de sustancias preferentes (solo ámbito nacional español, tabla I.2) de contaminantes que presentan un riesgo significativo para las aguas superficiales españolas debido a su especial toxicidad, persistencias o bioacumulación o por la importancia de su presencia en el medio acuático (RD 60/2011), no obteniendo ninguna coincidencia.

- Para concluir, se han insertado imágenes de algunos cromatogramas de muestras reales en los diferentes puntos de muestreos adquiridos en MSMS (figuras V.13 a la V.18), para que se vea como queda los cromatogramas adquiridos. Se pueden observar aparte de los compuestos identificados algunos picos en los cromatogramas, esto es debido a que presentan alguna transición, como en el caso de le figura V.16, donde se observa que tiene solo el ión 259, no siendo uno de los compuestos objeto de estudio. También se ha incluido una imagen de la misma muestra de la figura V.18, en Full Scan figura V.19, para que se compruebe la gran diferencia entre los cromatogramas, en función del modo de adquisición en el mismo equipo.

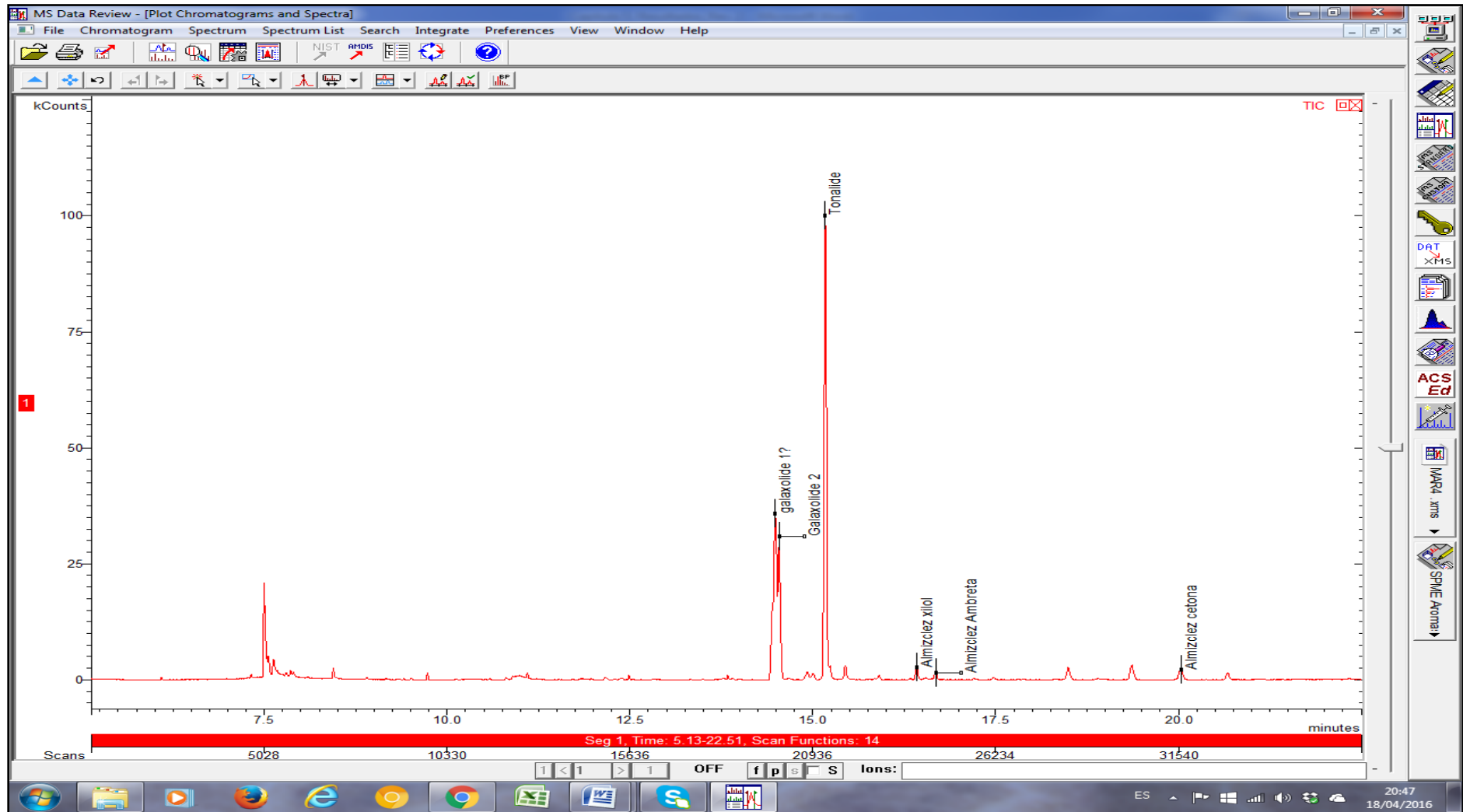


Figura V.13. Cromatograma de agua de mar en MSMS

ANÁLISIS DE FRAGANCIAS EN AGUAS MEDIANTE TÉCNICAS AVANZADAS DE CROMATOGRFÍA

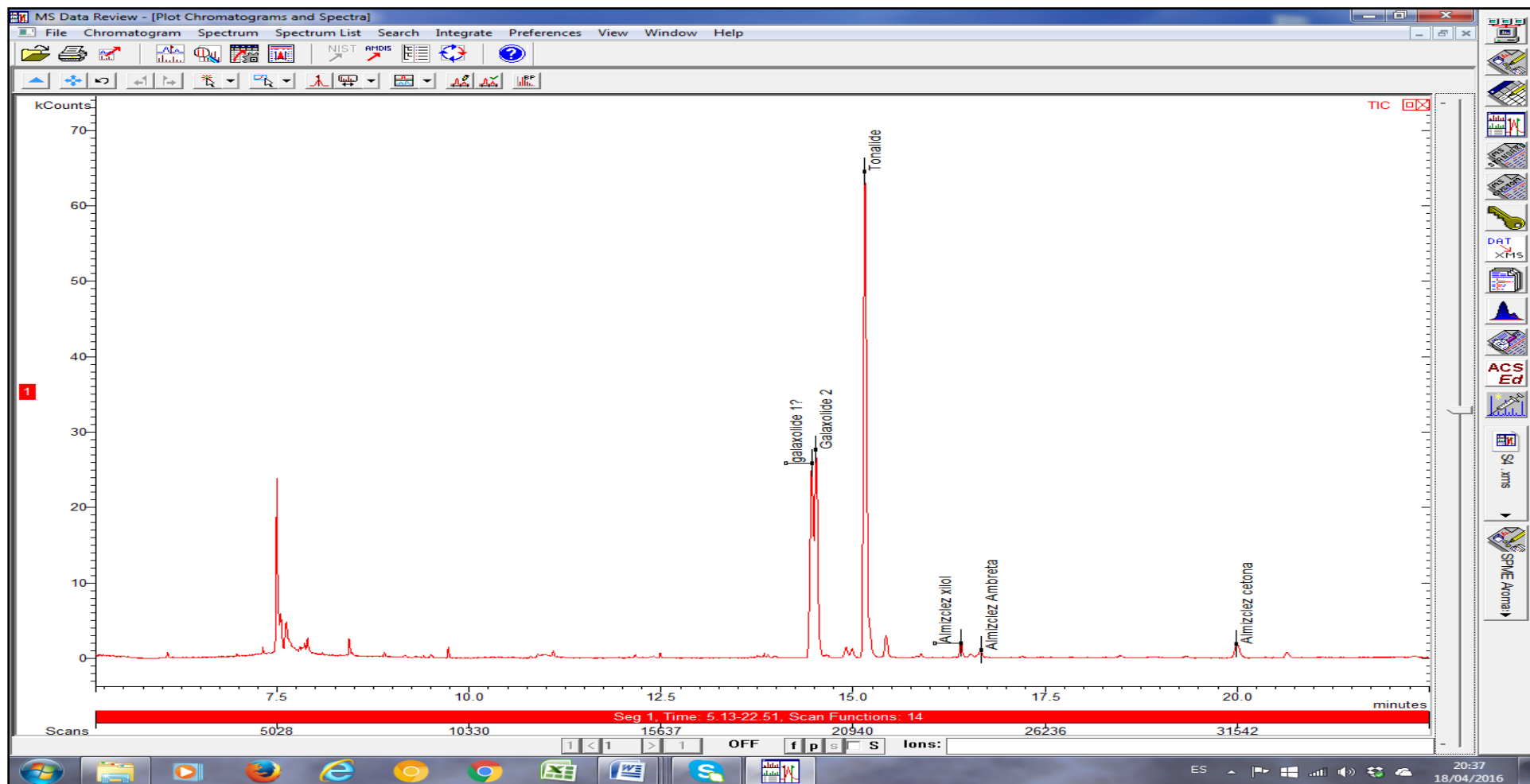


Figura V.14. Cromatograma de Sevilla, dársena del río Guadalquivir, en MSMS

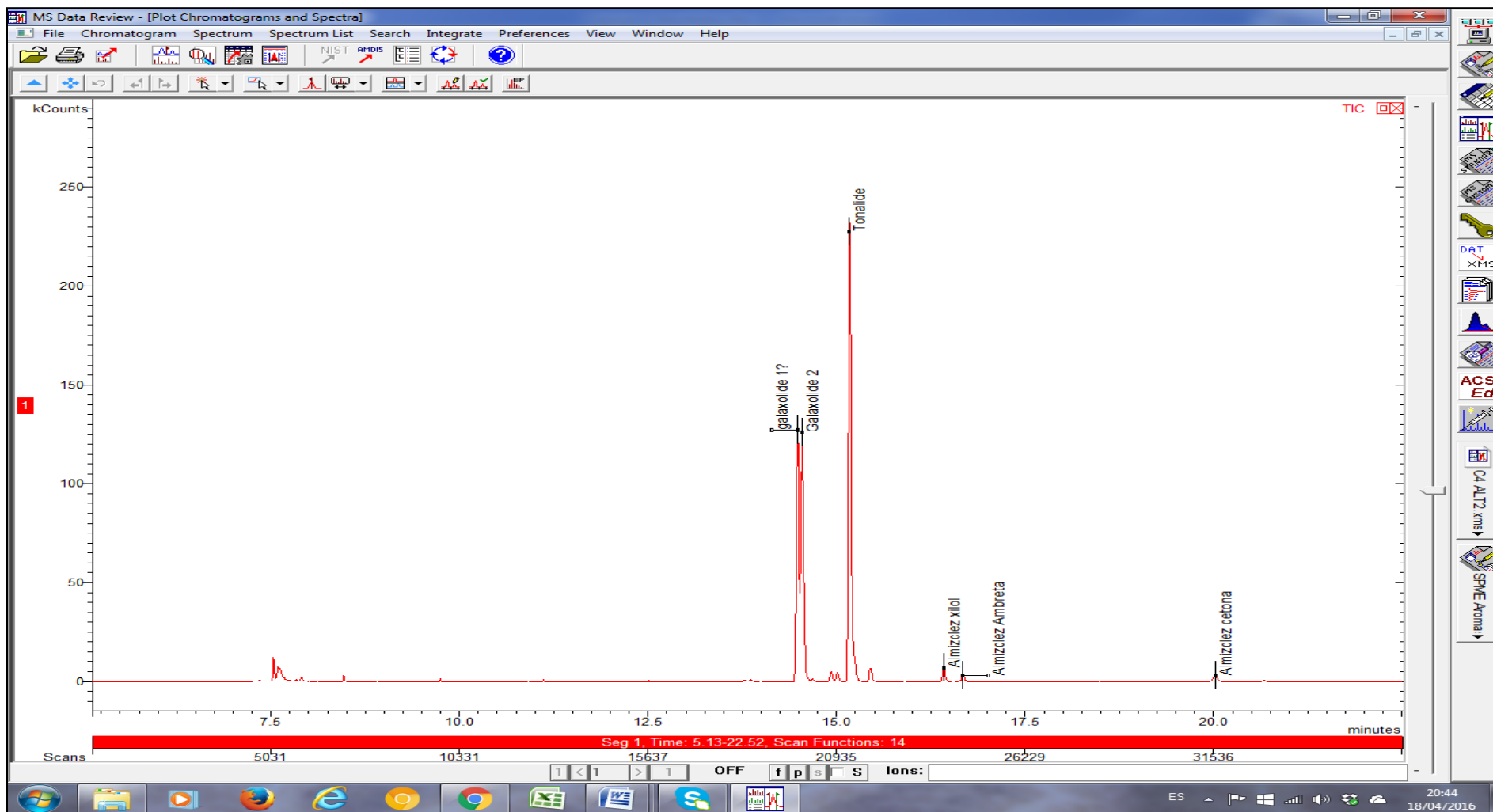


Figura V.15. Cromatograma de Coria del Río (cauce del río Guadalquivir) en MSMS

ANÁLISIS DE FRAGANCIAS EN AGUAS MEDIANTE TÉCNICAS AVANZADAS DE CROMATOGRFÍA

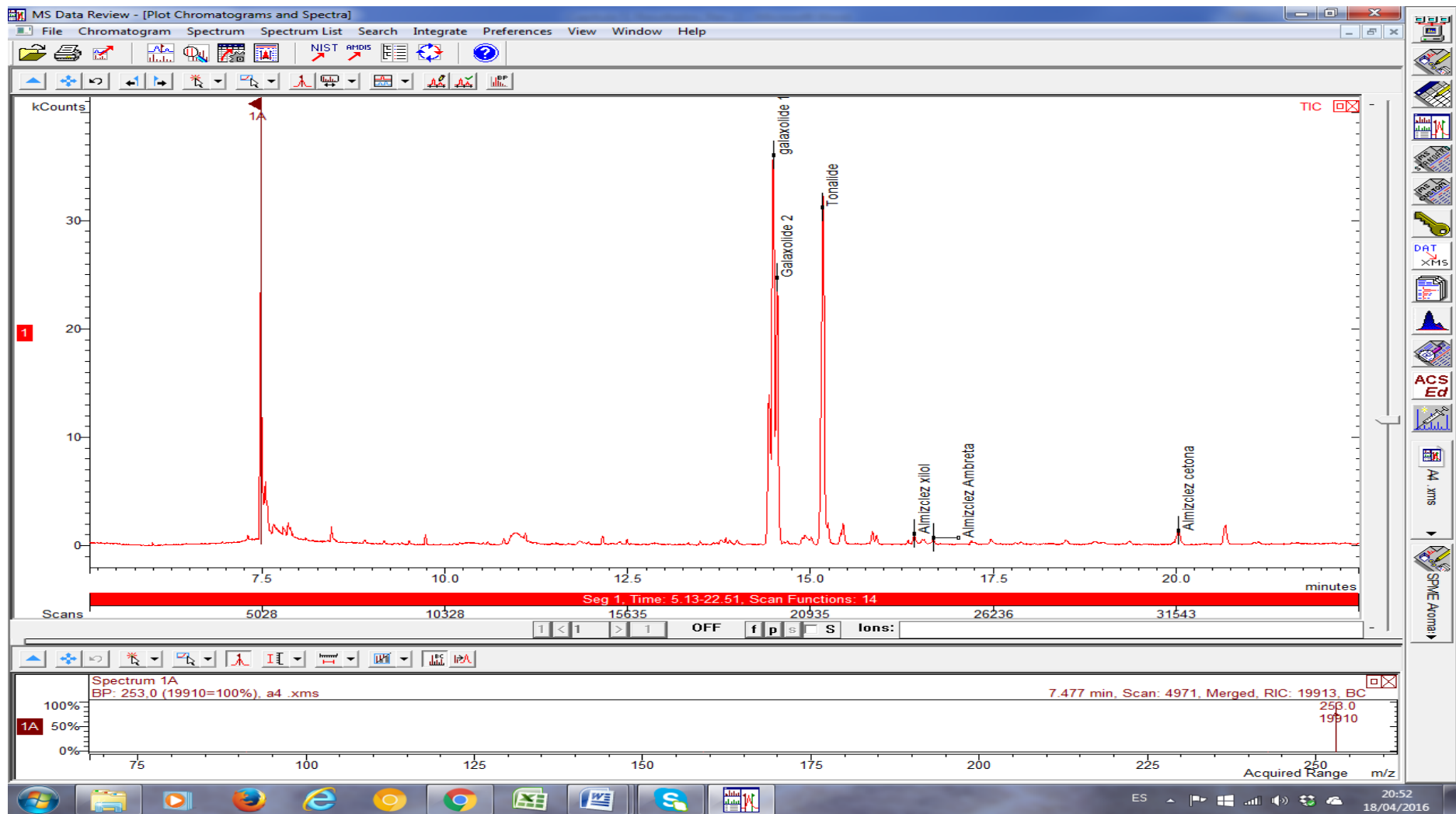


Figura V.16. Cromatograma de Alcalá de Guadaira (río Guadaira) en MSMS

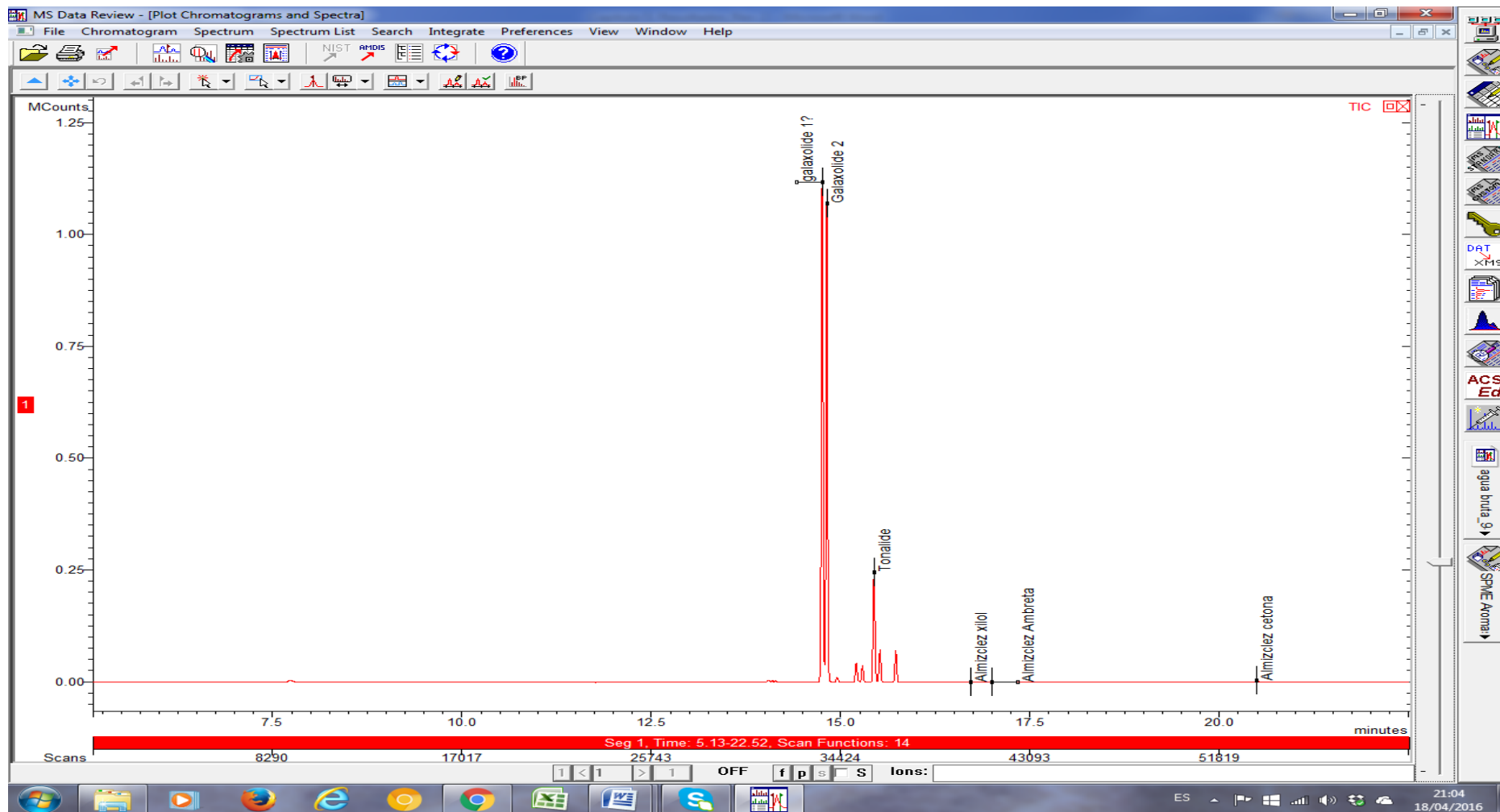


Figura V.17. Cromatograma de agua residual de la entrada al CENTA (agua bruta) en MSMS

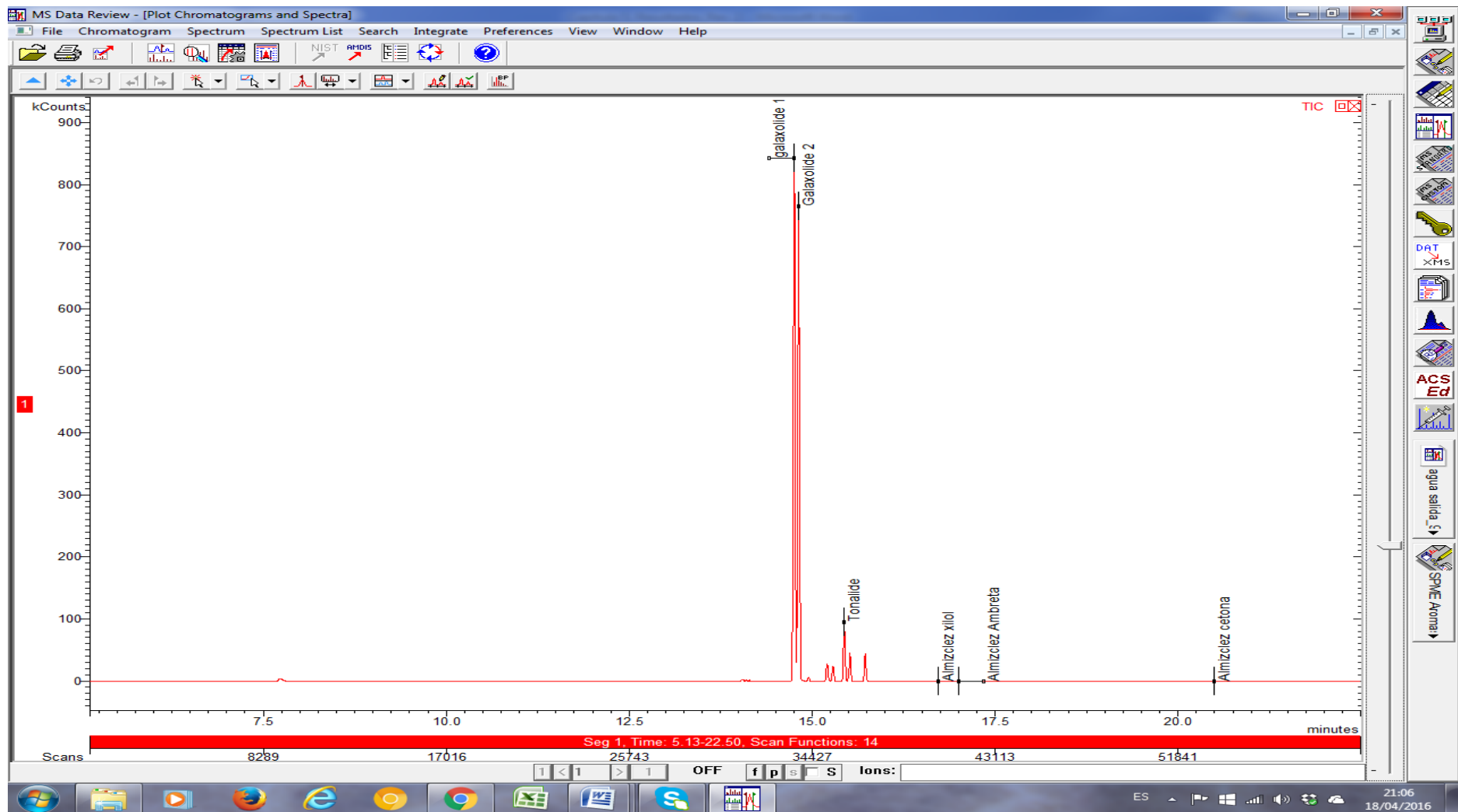


Figura V.18. Cromatograma de agua residual del Copero (ejemplo: salida del tratamiento primario) en MSMS

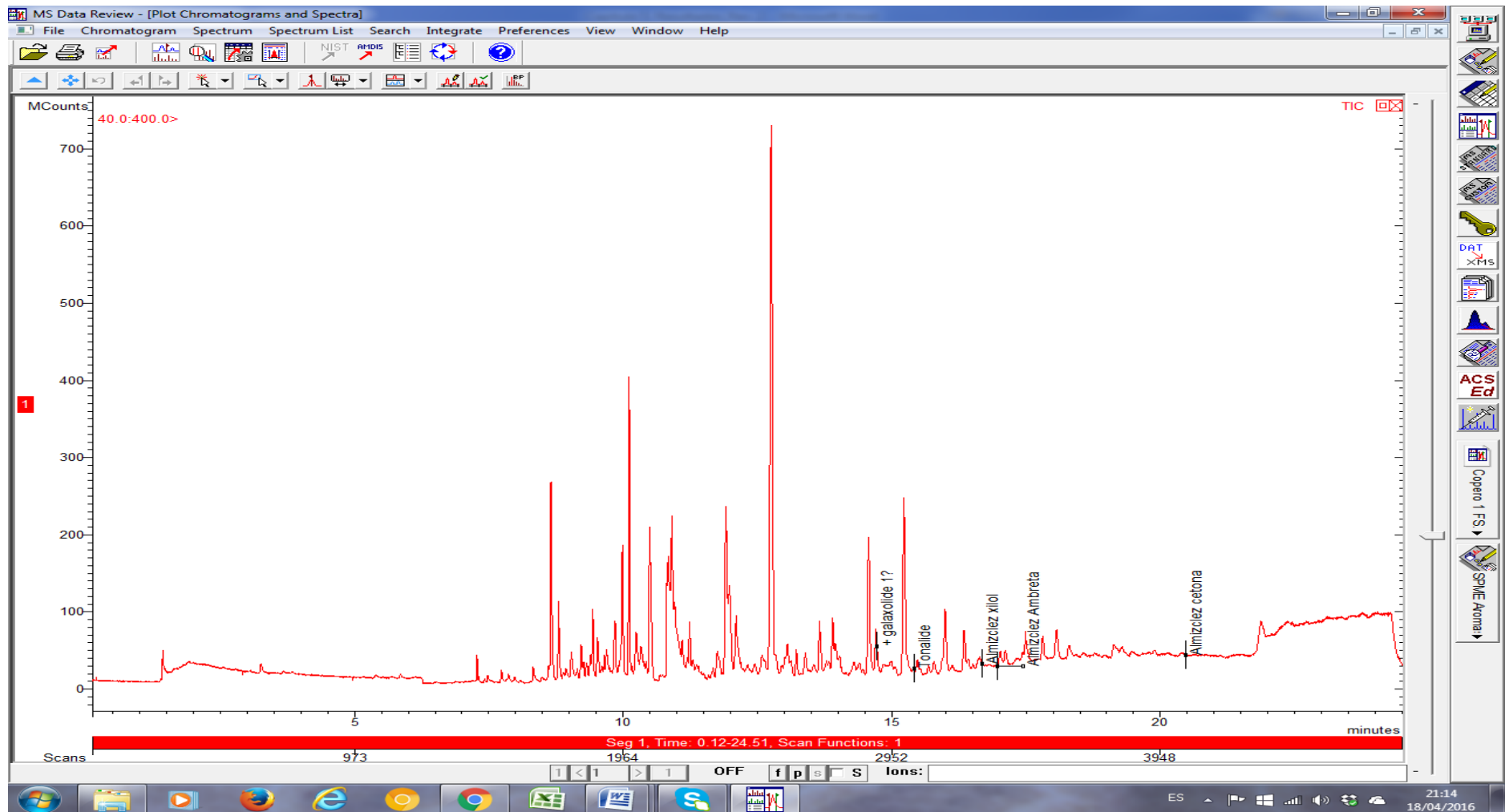


Figura V.19. Cromatograma de agua residual del Copero (ejemplo: salida del tratamiento primario) en Full Scan

RESUMEN
Y
CONCLUSIONES

En la presente Tesis Doctoral se ha realizado el estudio de optimización y validación de un método para su aplicación en análisis de rutina en muestras de aguas de los almizcles nitrogenados y policíclicos (galaxolide, tonalide, almizcles xileno, cetona y ambreta) más utilizados como fragancias. El interés práctico del tema radica en que en un futuro cercano es previsible que estos compuestos sean regulados legislativamente. Las matrices estudiadas en la que se encuentran estos contaminantes emergentes han sido aguas de río, aguas de mar y aguas residuales urbanas, aunque podría hacerse extensible a otros tipos de aguas de características similares. Asimismo, el método podría aplicarse, tras su correspondiente validación, a otros contaminantes emergentes que han sido identificados en las matrices estudiadas.

La metodología propuesta está basada en técnicas de cromatografía avanzada como es el análisis mediante cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas triplecuadrupolo. El estudio de optimización ha tenido en cuenta tanto las variables instrumentales como las variables químicas. El estudio de validación ha comprendido los parámetros indicadores de la calidad de la separación cromatográfica y de la determinación analítica. Se ha tomado como referencia principal la Guía SANTE/1945/2015 (más actual que la anterior Guía SANCO) y los criterios descrito en la UNE-EN ISO/IEC 17025:2005.

Las principales **CONCLUSIONES** obtenidas en la presente Tesis Doctoral han sido:

PRIMERA. Los ensayos realizados han puesto de manifiesto que la técnica más eficiente para la extracción de los cinco almizcles objeto de estudio es la microextracción en fase sólida mediante espacio en cabeza (SPME-HS). Los porcentajes de recuperación han sido en todos los casos superiores a 84,9 % e inferiores a 111% sobre muestras reales. En su conjunto estos datos son mejores que los obtenidos con la extracción líquido-líquido (50-125%) y similares a la extracción en fase sólida (89,1-102,7%), con la diferencia de que la respuesta cromatográfica en SPME es mucho más intensa, con lo cual el método es más sensible.

SEGUNDA. Para la optimización de la técnica de extracción seleccionada, se han comparado los resultados obtenidos con los distintos tipos de fibra existentes. Se ha concluido que para niveles de concentraciones de ng/L y para todos los compuestos, los mejores resultados fueron obtenidos utilizando la fibra de PDMS/DVB, de color azul, con 65 µm de grosor.

TERCERA. La combinación de la microextracción en fase sólida con la fibra seleccionada y la técnica de espacio en cabeza ha permitido desarrollar un método totalmente automatizado de extracción de los analitos presentes en las muestras de agua y su posterior separación y cuantificación por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas triplecuadrupolo,

CUARTA. El estudio de optimización del método ha permitido evaluar el efecto de las distintas variables que influyen y establecer sus valores óptimos. Se resumen las conclusiones obtenidas en las diferentes etapas del método analítico, con indicación de las variables estudiadas.

1. Parámetros de la extracción con SPME: adicción de NaCl (2 g), volumen de muestra en el vial (10 mL), tiempo de incubación (30 min), temperatura de incubación (100°C), tiempo de desorción de la fibra (5 min) y efecto del pH (neutro).
2. Parámetros de introducción de muestra:
 - a. Inyección líquida; volumen (10 µL), lavados de la aguja antes y después de la inyección (4 veces), llenado de muestra (50 % de la jeringa y eliminar), penetración de la aguja (95 % del vial), velocidad de llenado del embolo (5.000 µl/sg), retraso debido a la viscosidad (1,000 sg), coger y soltar muestras (3 veces), volumen de aire por debajo de la muestra (1,000 µl), velocidad de inyección (50,000 µl/sg) y tiempo de espera para la inyección antes y después de la misma (0,5 sg).
 - b. Inyección SPME: tiempo de preincubación (2 min), velocidad de preincubación (500 rpm), tiempo de agitación (2 min), velocidad de extracción (0 rpm), profundidad de la fibra (22 mm) y tiempo de preparación para la siguiente muestra (33 min).
3. Parámetros del inyector:
 - a. Inyección líquida: volumen de inyección (2 µl), modo splitless y 250 °C de temperatura.
 - b. Inyección líquida de grandes volúmenes (LVI): volumen de inyección (8 µl); rampa de split (20) /splitless/ split (50) y una rampa de temperatura inicial a 70 °C (0:50 min) y posterior subida (200 °C/ min) hasta 250°C (8:00 min).
 - c. Inyección SPME a 250°C y en modo splitless.

4. Parámetros de la determinación cromatográfica: columna (BR-sWAX de 30m, 0.25 mm, 0.25 μ m, compuesta 100% de polietilenglicol) y rampa de temperatura (comienza a 60 °C, 5 min, subida a 25 °C/min hasta 140 °C, 0 min, subida a 10 °C/min hasta 235 °C, 4 min. y subida a 25 °C/min hasta 250 °C, 2min).
5. Parámetros de la detección por espectrometría de masas:
 - a. Full Scan. Rango de masas 40 - 300 uma.
 - b. SIM. Masas seleccionadas 159, 213, 243, 253; 258, 268, 279, 282, 294 y 297, con sus voltajes óptimos,
 - c. Product Scan. Adquisición en Q3 en rangos desde 40 hasta la masa precursora, para todos los voltajes (5 - 45 V).
 - d. MRM. Transiciones seleccionadas para cada almizcle; MA (253 --> 91, 106; 268 --> 253); MK (279 --> 117, 118, 191); MX (282 --> 77, 91, 117); HHCB (243 -->143, 213; 258 --> 243); AHTN (258 --> 243; 243 --> 159, 187). Para un valor de scan time de 0,39 sg.
6. Parámetros del detector: adquisición del cromatograma (5 y 24,5 min), CID gas (on), captura de pico (en centroid), detector en modo EDR (Quad 1= 2.5 y Quad 3=1.5, con una anchura a mitad de pico de 0,70 uma). La cuantificación se realizó mediante calibración externa en un rango de trabajo de 2 -250 ng/L.

QUINTA. El estudio de validación de los distintos parámetros ha permitido comprobar experimentalmente la idoneidad del método para las aplicaciones previstas tanto en lo referente a la separación cromatográfica como a la determinación analítica. Se han cumplido, entre otros, todos los requisitos de aceptación de la guía SANTE/1945/2015, la cual cumple las condiciones descrita en la UNE-EN ISO/IEC 17025:2005. Se resumen las conclusiones obtenidas para ambos grupos de parámetros.

1. Parámetros de calidad de la separación cromatográfica: tiempo de retención (SD < 0,1 min), factor de capacidad (4,8- ,1), factor de selectividad ($\alpha > 1$), factor de resolución ($\geq 1,5$ menos para el HHCB) y eficacia de la separación ($N > 546.564$ platos teóricos).
2. Parámetros de calidad de la determinación analítica: selectividad y especificidad (elección de un ión cuantificador y dos iones cualificadores), linealidad ($r > 0,996$ $SDR_b > 95$ %), factor de respuesta $< \pm 20$ %, estudios de residuales correctos), rango de trabajo (2-250 ng/L), veracidad (84,9-111 %), repetitividad (RSD < 7,97%), reproducibilidad (RSD < 13,45 %),

LOD ($\leq 4,68$ ng/L), LOC ($\leq 15,69$ ng/L) (niveles de pg/L para galaxolide y tonalide), robustez (satisfactoria en todos los rangos) e incertidumbre ($U_{\text{expandida}} < 17,2 \%$).

SEXTA. Se ha evaluado la aplicabilidad del método a un total de 44 muestras reales de aguas de río, mar y aguas residuales urbanas, recogidas durante un año en 11 puntos de muestreo, durante cada una de las estaciones meteorológicas. Las conclusiones principales son las siguientes.

1. No se ha observado efecto matriz, al tener recuperaciones entre 84,9 y 111% para todos los compuestos.
2. Los valores más altos fueron medidos en las aguas residuales urbanas, en niveles de $\mu\text{g/L}$. Por el contrario, los valores más bajos fueron obtenidos en las aguas de mar, midiéndose valores bajos de ng/L de galaxolide y tonalide, que son los compuestos más abundantes en las aguas de río.
3. Los valores de concentración más altos se encontraron en las muestras tomadas en primavera y los valores más bajos en verano, debido probablemente al efecto de las altas temperaturas.
4. Los valores medidos en todas las matrices están en consonancia con los obtenidos por otros investigadores en estudios publicados en otros lugares.
5. Este ha sido el primer estudio realizado en Andalucía para este tipo de contaminantes emergentes, obteniendo resultados similares a otras zonas del norte de España y de otros países.

SEPTIMA. La evaluación de la eficacia de eliminación de estos contaminantes en las estaciones depuradoras de aguas residuales urbanas, tanto de tecnologías convencionales como de tecnologías avanzadas, ha conducido a estas conclusiones.

1. EDAR con tecnologías convencionales. Los porcentajes medios de eliminación tras los tratamientos primario y secundario fueron de 27,75 % y 70,25 %, respectivamente.
2. EDAR con tecnologías avanzadas. Se han alcanzado valores de hasta 49,33 % tras el tratamiento primario y de 81,42 % tras el secundario, mayores en ambos casos que los obtenidos con la tecnología convencional.
3. En ambos casos, en los tratamientos primarios las eliminaciones no son muy eficaces.

OCTAVA. Se ha realizado un estudio cualitativo de identificación de otros contaminantes emergentes en las muestras analizadas haciendo especial hincapié en aquellos que figuran en el Reglamento REACH y otras normativas comunitarias, desde el punto de vista de su potencial peligrosidad. Se destaca el grupo de los ftalatos que son compuestos presentes en los plásticos y por otro lado, el almizcle xileno presente en las fragancias de multitud de productos del hogar y cosméticos, objeto de estudio en esta Tesis Doctoral.

BIBLIOGRAFÍA

AISE (2001). Annual Review 2000. Serving Consumers Responsibly. Association Internationale de la Savonnerie, de la Détergence et des Produits d'Entretien AISE, Brussels. (pagina visitada 15/07/2014) www.aise-net.org

Alvarino, T., Suárez, S., Lema, J.M., Omi, F. (2014): Understanding the removal mechanisms of PPCPs and the influence of main technological parameters in anaerobic UASB and aerobic CAS reactors *Journal of Hazardous Materials*, 278: 506–513.

Anon. (1988): Study predicts geographical shift in musk aroma chemical production. *Soap Cosmet. chem. Special.*, 64: 88.

Api, A.M., Ford, R.A., (1999): Evaluation of the oral subchronic toxicity of AHTN and HHCB in the rat, *Toxicol. Lett.* 2: 263–267.

Api, A.M., Gudi, R. (2000): An in vivo mouse micronucleus assay on musk ketone. *Mutat Res*, 464(2):263–267.

Arbulu, M., Sampedro, M.C., Unceta, N., Gomez-Caballero, A., Goicolea, M.A., Barrio, R.J. (2011): A retention time locked gas chromatography–mass spectrometry method based on stir-bar sorptive extraction and thermal desorption for automated determination of synthetic musk fragrances in natural and wastewaters. *J. Chromatogr. A*, 1218: 3048–3055.

Arcidiacono, G. (2014). Calculadora estadística: Diagrama de caja. Alcula. Pagina web consultada: 22-04-2016. <http://www.alcula.com/es/calculadoras/estadistica/diagrama-de-caja/>

Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. Productos de cosmética e higiene. Página web consultada 22/06/2015. http://www.aemps.gob.es/cosmeticosHigiene/cosmeticos/docs/inventario_cosmet_junio06.pdf

Aznar, A., Alonso, A. (2000): Determinación de los parámetros físico-químicos de calidad de las aguas. *Gestión Ambiental*, 2(23): 12-19.

Balk, F., Ford, R.A. (1999): Environmental risk assessment for the polycyclic musks, AHTN and HHCB: II. Effect assessment and risk characterisation *Toxicol. Lett.*, 111: 81–94.

Barbetta, L., Trowbridge, T. y Eldib, I.A. (1988): Musk aroma chemical industry. *Perfum. Flavor.*, 13: 60-61.

Barceló, D. y López, M.J.(2007): Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. En: Panel Científico- Técnico de seguimiento de la política de aguas. Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales-CSIC. Barcelona (pagina web consultada 06/07/2015).

Becerril, J. (2009): Contaminantes Emergentes en el Agua. *Revista Digital Universitaria.*, 10 (8): 1-7.

Bester, K. (2009): Analysis of musk fragrances in environmental samples. *J. Chromatogr. A*, 1216: 470–480.

Bester, K., Hüffmeyer, N., Schaub E., Klasmeier, J. (2008): Surface water concentrations of the fragrance compound OTNE in Germany – A comparison between data from measurements and models. *Chemosphere* 73, 1366–1372.

Bester, K. (2004): Retention characteristics and balance assessment for two polycyclic musk fragrances (HHCB and AHTN) in a typical German sewage treatment plant. *Chemosphere*, 57: 863–870.

Birkholz, D.A., Stilson, S.M., Elliott. H.S. (2014): Análisis de Emergentes contaminantes del agua potable - Una revisión. Módulo de referencia en Sistemas de la Tierra y Ciencias Ambientales, de Integral y Calidad del Agua Purificación, 2: 212-229.

Birnbaum, L.S. y Staskal, D.F. (2004): Brominated Flame Retardants: Cause for Concern? En: *Environmental Health Perspectives.*, 112 (1): 9-17.

Bitsch, N., Dudas, C., Korner, W., Failing, K., Biselli, S., Rimkus, G., Brunn, H. (2002): Estrogenic activity of musk fragrances detected by the E-screen assay using human mcf-7 cells. *Arch Environ Contam Toxicol*, 43(3):257–264.

Bogdal, C., Schmid, P., Zennegg, M., Anselmetti, F.S., Scheringer, M., Hungerbühler, K. (2009): Blast from the past: melting glaciers as a relevant source for persistent organic pollutants. *Environ Sci Technol*, 43(21):8173–8177.

Breitholtz, M., Wollenberger, L., Dinan, L. (2003): Effects of four synthetic musks on the life cycle of the harpacticoid copepod *Nitocra spinipes*. *Aquatic Toxicology*, 63: 103-118.

Buerge, I. J. (2009): Ubiquitous occurrence of the artificial sweetener acesulfame in the aquatic environment: An ideal chemical marker of domestic wastewater in groundwater. *Environ. Sci. Technol.* 43 (12): 4381-4385.

Carballa, M., Omil, F., Lema, J.M. (2008): Comparison of predicted and measured concentrations of selected pharmaceuticals, fragrances and hormones in Spanish sewage. *Chemosphere*, 72: 1118–1123.

Carballa, M., Omil, F., Lema, J.M., Llompart, M., García-Jares, C., Rodríguez, I., Gómez, M., Ternes, T. (2004): Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water Research* 38, 2918-2926.

Carlsson, G., Orn, S., Andersson, P.L., Soderstrom, H., Norrgren, L. (2000): The impact of musk ketone on reproduction in zebrafish (*Danio rerio*). *Mar Environ Res*, 50(1–5):237–241.

CEM (Centro Español de metrología). Pagina web consultada (17/02/2016) http://www.cem.es/cem/metrologia/glosario_de_terminos?term_node_tid_depth_1=22.

Chaparro, M.C.(2012): Optimización y validación de metodología para la determinación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos en aceite de oliva y en aceitunas por GC-MS. Trabajo fin de master de estudios avanzados en química, Universidad de Sevilla, 67-68.

Chase, D.A., Karnjanapiboonwong, A., Fang, Y., Cobb, G. (2012): Occurrence of synthetic musk fragrances in effluent and non-effluent impacted environments. *Science of the Total Environment*, 416: 253–260.

Chen, C., Zhou, Q., Liu, S., Xiu, Z. (2011): Acute toxicity, biochemical and gene expression responses of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to polycyclic musks. *Chemosphere*, 83: 1147–1154.

Christian, M.S., Parker, R.M., Hoberman, A.M., Diener, R.M., Api, A.M. (1999): Developmental toxicity studies of four fragrances in rats. *Toxicol Lett*, 111(1–2):169–174.

Chou, Y.J., Dietrich, D.R. (1999): Interactions of nitromusk parent compounds and their amino-metabolites with the estrogen receptors of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the South African clawed frog (*Xenopus laevis*). *Toxicol Lett*, 111(1–2):27–36.

Chou, Y.J., Dietrich, D.R. (1999): Toxicity of nitromusks in early lifestages of South African clawed frog (*Xenopus laevis*) and zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol Lett*, 111(1–2):17–25.

CITIUS, Centro de investigación tecnología e innovación de la Universidad de Sevilla. (Página web visitada: 14/03/2016) <http://investigacion.us.es/scisi/sgi>

Claraa, M., Strenna, B., Gansb, O., Martinez, E., Kreuzingera, N., Kroissa, H. (2005) Removal of selected pharmaceuticals, fragrances and endocrine disrupting compounds in a membrane bioreactor and conventional wastewater treatment plants. *Water Research*, 39: 4797–4807.

Claraa, M., Gans, O., Windhofer, G., Krenn, U., Hartl, W., Braun, K., Scharf, S., Scheffknecht, C. (2011): Occurrence of polycyclic musks in wastewater and receiving water bodies and fate during wastewater treatment. *Chemosphere*, 82: 1116–1123.

Clarke, B.O., Smith, S.R. (2011): Review of ‘emerging’ organic contaminants in biosolids and assessment of international research priorities for the agricultural use of biosolids. *Environ. Int.*, 37:226–47.

CITES (Convention on the International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna) (Página web visitada: 14/03/2016) <https://www.cites.org/>

Committee on the Assessment of Water Reuse as an Approach to Meeting Future Water Supply Needs (2012): *Water Reuse: potential for expanding the Nation’s water supply through reuse of Municipal wastewater*. In Washington, DC: The National Academies Press; (Página web visitada: 27/02/2016) <http://www.nap.edu/read/13303/chapter/1>

COLIPA (2004). *The European cosmetic toiletry & perfumery market 2000*. European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association Colipa, Brussels. (página visitada 15/07/2014) www.colipa.com

Correia, P., Cruz, A., Santos, L., Alves, A. (2013): Human dermal exposure to galaxolide from personal care products. *Int. J. Cosmet. Sci.*, 35: 299–309.

Cuadros, L., Gámiz, L., Carrasco, A. y Ruiz, C. (2003): *Glosario de términos analíticos (1ª edición)*, (rev. 1). GRASEQA.

Cunha, S.C., Fernandes, J.O., Vallecillos, L., Cano-Sancho, G., Domingo, J.L., Pocurull, E., Borrull, F., Maulvault, A.L., Ferrari, F., Fernandez-Tejedor, M., Heuvel, F., Kotterman, M. (2015): Co-occurrence of musk fragrances and UV-filters in seafood and macroalgae collected in European hotspots. *Environ Res* (Página web 26/02/2016). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25985745>

Daughton, C. (2004): Non-regulated water contaminants: emerging research. *Environ Impact Asses Rev.*, 24: 711-32.

Daughton, C. y Ternes, T.A. (1999): Pharmaceuticals and personal Care products in the Environment: Agents of Subtle Change?. En: *Health perspect.*, 107 (6): 907-938.

Decisión de la comisión (2006/257/CE) de 9 de febrero de 2006 que modifica la Decisión 96/335/CE, por la que se establece un inventario y una nomenclatura común de ingredientes empleados en los productos cosméticos. http://www.aemps.gob.es/cosmeticosHigiene/cosmeticos/docs/inventario_cosmet_junio_06.pdf. (Página web 26/02/2016).

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.

Decisión nº 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 (Texto pertinente a efectos del EEE).

Directiva 2008/32/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 11 de marzo de 2008 que modifica la Directiva 2000/60/CE por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas, por lo que se refiere a las competencias de ejecución atribuidas a la Comisión.

Directiva 2009/31/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de abril de 2009 relativa al almacenamiento geológico de dióxido de carbono y por la que se modifican la Directiva 85/337/CEE del Consejo, las Directivas 2000/60/CE, 2001/80/CE, 2004/35/CE, 2006/12/CE, 2008/1/CE y el Reglamento (CE) no 1013/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo.

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.

Directiva 2013/64/UE del Consejo, de 17 de diciembre de 2013 , por la que se modifican las Directivas 91/271/CEE y 1999/74/CE del Consejo y las Directivas 2000/60/CE, 2006/7/CE, 2006/25/CE y 2011/24/UE del Parlamento Europeo y del Consejo como consecuencia de la modificación del estatuto de Mayotte respecto de la Unión Europea.

Decisión de ejecución (UE) 2015/495 de la comisión, de 20 de marzo de 2015 por la que se establece una lista de observación de sustancias a efectos de seguimiento a nivel de la Unión en el ámbito de la política de aguas, de conformidad con la Directiva 2008/105/CE del Parlamento Europeo y del Consejo.

Directiva 2004/88/CE de la Comisión de 7 de septiembre de 2004 por la que se modifica la Directiva 76/768/CEE del Consejo, relativa a los productos cosméticos, para adaptar su anexo III al progreso técnico. *Diario Oficial de la Unión Europea* nº L287 de 8/9/2004, 5-6. http://ec.europa.eu/enterprise/cosmetics/doc/2004_88/es88.pdf

(Página web visitada 24/02/2016)

Directiva 95/34/CE de la Comisión de 10 de Julio de 1995, por la que se adaptan al progreso técnico los Anexos II, III, VI y VII de la Directiva 76/768/CEE del Consejo relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materia de productos cosméticos. Diario Oficial de la Unión Europea nº L167 de 18/07/1995, 19-21. (página web visitada 24/02/2016).

<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31995L0034:ES:HTML>

Directiva 98/62/CE de la Comisión de 3 de septiembre de 1998 por la que se adaptan al progreso técnico los anexos II, III, VI y VII de la Directiva 76/768/CEE del Consejo relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materia de productos cosméticos. Diario Oficial de la Unión Europea nº L253 de 15/9/1998, 20-23.

<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31998L0062:ES:HTML>

(página web visitada 24/02/2016).

Dordio, A., Carvalho, A.J.P., Martins Teixeira, D., Barrocas Dias, C., Pinto, A.P.(2010): Removal of pharmaceuticals in microcosm constructed wetlands using *Typha* spp. and LECA. *Bioresour. Technol.* 101, 886–892.

Draisci, R., Marchiafava, C., Ferretti, E., Palleschi, L., Catellani, G., Anastasio, A. (1998): Evaluation of musk contamination of freshwater fish in Italy by accelerated solvent extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A*, 814: 187–197.

Dsikowitzky, L., Schwarzbauer, j., Kronimus, A., Littke, R. (2004): The anthropogenic contribution to the organic load of the Lippe River (Germany). Part I: qualitative characterization of low-molecular weight organic compounds. *Chemosphere* 57, 1275–1288.

Duedahl-Olesen, L., Cederberg, T., Høgsbro, K., Højgaard, A. (2005): Synthetic musk fragrances in trout from Danish fish farms and human milk. *Chemosphere*, 61: 422–431.

Eggen, T., Moeder, M. y Arukwe, A. (2010): Municipal landfill leachates: A significant source for new and emerging pollutants. *En: Science of the Total Environment.*, 408 (21): 5147-5157.

Eisenhardt, S., Runnebaum, B., Bauer, K., Gerhard, I. (2001): Nitromusk compounds in women with gynecological and endocrine dysfunction. *Environ Res*, 87(3):123–130.

Eschke, H.D., Traud, J., Dibowski, H.J. (1994): Untersuchungen zum Vorkommen polycyclischer Moschus-duftstoffe in verschiedenen Umweltkompartimenten. 1. Mitteilung. Nachweis und Analytik mit GC/MS in Oberflächen-, Abwässern und Fischen. *UWSF-Z. Umweltchem. Ökotox.*, 6: 183–189.

Eschke, H.D., Dibowski, H.-J., Traud, J. (1995): Untersuchungen zum Vorkommen polycyclischer Moschus-duftstoffe in verschiedenen Umweltkompartimenten. 2. Mitteilung. Befunde in Oberflächen-, Abwässern und Fischen sowie in Waschmitteln und Kosmetika. *UWSF-Z. Umweltchem. Ökotox.*, 7: 131–138.

Estadística diagrama de caja y bigote.
<http://www.alcula.com/es/calculadoras/estadistica/diagrama-de-caja/>. (Página web visitada 24/02/2016)

European Commission, 2002. Twenty-sixth Commission Directive 2002/34/EC of 15 April 2002 adapting to technical progress Annexes II, III, VII to Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products. Official Journal of the European Communities L 015, 19–31.

European Parliament, (2009): Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products, Official Journal of the European Union, 342: 59–209.

European Union Risk Assessment Report: 5-Tert-butyl-2,4,6-trinitro-m-xylene (Musk xylene). (2005): European Commission. Joint Research Centre. Institute for Health and Consumer Protection. European Chemicals Bureau. (Página web visitada 24/02/2016) <http://echa.europa.eu/documents/10162/dc1a179e-699e-44c2-b4ad-371b9b89efab>

European Union Risk Assessment Report: 4'-Tert-butyl-2',6'-dimetil-3',5'-dinitroacetophenone (Musk ketone). (2005): European Commission. Joint Research Centre. Institute for Health and Consumer Protection. European Chemicals Bureau. (Página web visitada 24/02/2016) <http://echa.europa.eu/documents/10162/e6a84904-118b-447a-8766-f7bda48f7ce0>

Extracción líquido-líquido pagina web consultada (01/09/2015): http://ocw.unizar.es/ocw/ciencias-experimentales/tecnicas-basicas-de-laboratorio-quimico/teoria/Extraccion_teoría.pdf

Federle, T., Sun, P., Dyer, S., Kiel, B. (2014): Probabilistic assessment of environmental exposure to the polycyclic musk, HHCB and associated risks in wastewater treatment plant mixing zones and sludge amended soils in the United States. *Science of the Total Environment*, 493: 1079–1087.

Fent, K., Weston, A. y Caminada, D. (2006): Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat Toxicol.*, 76: 122-59.

Flavor and Extract Manufacturers' Association (1995) Monograph: Musk Ambrette, Washington DC

Ford, R.A., Domeyer, B., Easterday, O., Maier, K., Middleton, J.(2000): Criteria for development of a database for safety evaluation of fragrance ingredients. *Regul Toxicol Pharmacol*, 31(2 Pt 1): 166–181.

Frater, G., Mueller, U. y Kraft, P. (1999): Preparation and olfactory characterization of the enantiomerically pure isomers of the perfumery synthetic Galaxolide (R). *Helv. Chim. Acta*, 82 (10): 1656-1665.

Fritz, J. (1999): Analytical solid-phase extraction. Canada, John Wiley & Sons., 437p.

Garcia, G (2002): Ciencias de la Tierra y del Medio Ambiente (libro electrónico). Enfermería Comunitaria I. Salud Pública. Masón. Tema 11. <http://ocw.unican.es/ciencias-de-la-salud/salud-publica-y-atencion-primaria-de-salud/otros-recursos-1/lecturas/bloque-iii/Contaminacion%20del%20agua.pdf> (pagina web consultada 06/07/2015).

Garrett, P. y Moreau, M.(1986): MTBE as a ground water contaminant. NWWA/API conference on petroleum hydrocarbons and organic chemicals in ground water: prevention, detection and restoration. Dublin, Ohio, Houston, Texas. National Water Well Association., 227–238.

Gatermann, R., Hellou, J., Hu"hnerfuss, H., Rimkus, G., Zitko, V. (1999): Polycyclic and nitro musks in the environment: a comparison between Canadian and European aquatic biota samples. *Chemosphere*, 38: 3431–3441.

Gatermann, R., Biselli, S., Hu"hnerfuss, H., Rimkus, G.G., Franke, S., Hecker, M., Kallenborn, R., Karbe, L., Ko"nig, W.A. (2002): Synthetic musks in the environment. Part 2: Enantioselective transformation of the polycyclic musk fragrances HHCB, AHTN, AHDI and ATII in freshwater fish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 42: 447–453.

Gerzabek, M. H. (2007): The integrated project Aqua-Terra of the EU sixth framework lays foundations for better understanding of river–sediment–soil–groundwater systems. *J. Environ Manage.*, 84: 237–43.

Gil, M.J., Soto, A.M., Usma, J.I., Gutiérrez, O.D. (2012): Emerging contaminants in waters: effects and possible treatments. *Producción + Limpia*, 7 (2): 52-73.

Godfrey, E., Woessner, W. y Benotti, M. (2007): Pharmaceuticals in on-site sewage effluent and ground water, Western Montana. *Ground Water.*, 45: 263–271.

Jobling, S. (1995): A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ Health Perspect.*, 103: 582–587.

Gómeza, M.J., Gómez, M.M., Agüera, A., Mezcua, m., Herrera, S., Fernández, A.R. (2009): A new gas chromatography/mass spectrometry method for the simultaneous analysis of target and non-target organic contaminants in waters. *Journal of Chromatography A*, 1216: 4071–4082.

Granda, F., Valencia, S., Marín, J.M., Restrepo, G. (2011): Optimización del método de microextracción en fase sólida acoplada a cromatografía gaseosa para análisis de metanol en agua. *Rev. Colomb. Quím.*,40(2): 201-210.

Green, M. (1994.): Examination of bromocyclene and musk xylene in trouts and feeding stuffs for trouts. *Lebensmittelchemie*, 48: 6–14.

Gregoraszczyk, E.L., Ptak, A., Skaare, J.U., Mularz, K., Chmielowiec, A., Wojtowicz, A., Ropstad, E. (2009): Mechanisms of action of two different natural mixtures of persistent organic pollutants (POPs) in ovarian follicles. *Xenobiotica*, 39(1):80–89.

Guéguen, M., Amiard, J.C., Arnich, N., Badot, P.M., Claisse, D., Guérin, T., Vernoux, J.P.(2011): Shellfish and residual chemical contaminants: hazards, monitoring, and health risk assessment along French coasts. *Rev Environ Contam Toxicol.*, 213: 55-111.

Guía para solucionar los problemas de microextracción en fase solida. Analytical solutions from Sigma Aldrich. Pagina web consultada 27/02/2016. <http://www.sigmaaldrich.com/>

JCGM 200 :2008. Vocabulario Internacional de Metrología Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados VIM.

Janzen, N., Dopp, E., Hesse, J., Richards, J., Türk, J., Bester, K. (2011): Transformation products and reaction kinetics of fragrances in advanced wastewater treatment with ozone *Chemosphere*, 85: 1481–1486.

Jennings, W., Shibamoto, T. (1980): Qualitative analysis of flavor and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography. Academic press, New York, 43p.

Hajkova, K., Pulkrabova, J., Hajslova, J., Randak, T., Zlabek, V. (2007): Chub (*Leuciscus cephalus*) as a bioindicator of contamination of the Vltava River by synthetic musk fragrances. *Arch Environ Contam Toxicol*, 53(3):390–396.

Halling-Sørensen, B., Nielsen, S.N., Lanzky, P.F., Ingerslev, F., Lützhøft, H.C.H., Jørgensen, S.E. (1998). Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – a review. *Chemosphere* 36, 357–394.

Harris, 1999. Análisis químico cuantitativo. editorial: Reverté.

Hawkins, D.R., Elsom, L.F., Kirkpatrick, D., Ford, R.A., Api, A.M. (2002): Dermal absorption and disposition of musk ambrette, musk ketone and musk xylene in human subjects. *Toxicol Lett*, 131(3):147–151.

HERA Risk Assessment of AHTN (6-Acetyl-1,1,2,4,4,7-hexamethyltetraline). (2004): Version 2.0, October 2004. Human and Environmental Risk Assessment on ingredients of Household Cleaning Products (HERA). <http://www.heraproject.com/files/28-HH-04-pcm%20AHTN%20HERA%20Human%20Health%20DISCL%20ed2.pdf>
(Página web visitada : 24/02/2016)

HERA Risk Assessment of HHCB (1,3,4,6,7,8-hexahydro-4,6,6,7,8,8-hexamethylcyclopenta- γ -2-benzopyran and related isomers). (2004). Version 2.0, Human and Environmental Risk Assessment on ingredients of Household Cleaning Products (HERA). <http://www.heraproject.com/files/29-HH-04-pcm%20HHCB%20HERA%20Human%20Health%20DISCL%20ed2.pdf>
(Página web visitada : 24/02/2016)

Heberer, T. (2011): Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. *Journal of Hydrology.*, 266 (3-4): 175-189.

Herberer, T., Gramer, S., Stan, H. (1999): Occurrence and distribution of organic contaminants in the aquatic system in the Berlin Part III: determination of synthetic musks in berlin surface water applying Solid-Phase Microextraction (SPME). *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 27(3):150–156.

Henríquez, D. (2010): Presencia de contaminantes emergentes en aguas y su impacto en el ecosistema. Estudio de caso: productos farmacéuticos en la cuenca del río Biobío, región del Biobío, Chile. Tesis, Santiago de Chile.

Hijosa; M., Sidrach, R., Martín, J. (2011): Statistical modelling of organic matter and emerging pollutants removal in constructed wetlands. *Bioresource Technology*, 102: 4981–4988.

Homem, V., Silva, J.A., Cunha, C., Alves, A., Santos, L. (2013): New analytical method for the determination of musks in personal care products by Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe extraction followed by GC–MS. *J. Sep. Sci.*, 36: 2176–2184.

Homem, V., Silva, E., Alves, A., Santos, L. (2015): .Scented traces – Dermal exposure of synthetic musk fragrances in personal care products and environmental input assessment. *Chemosphere*, 139: 276–287.

Homem, V., Silva, J.A., Ratola, N., Santos, L., Alves, A. (2015): Long lasting perfume – a review of synthetic musks in WWTPs. *J. Environ. Manage.*, 149: 168–192.

Hopkins, M.N., Lambert, A.H. (1996): AHTN: 13-week oral (dietary) toxicity in the rat with a 4-week treatment-free period. Report RFA/5/95 to RIFM.

Hutter, H.P., Wallner, P., Hartl, W., Uhl, M., Lorbeer, G., Gminski, R., MerschSundermann, V., Kundi, M. (2010): Higher blood concentrations of synthetic musks in women above fifty years than in younger women. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 213: 124–130.

Hutter, H.P., Wallner, P., Moshhammer, H., Hartl, W., Sattelberger, R., Lorbeer, G., Kundi, M. (2005): Blood concentrations of polycyclic musks in healthy young adults. *Chemosphere*, 59: 487–492.

Hutter, H.P., Wallner, P., Moshhammer, H., Hartl, W., Sattelberger, R., Lorbeer, G., Kundi, M. (2009): Synthetic musks in blood of healthy young adults: relationship to cosmetics use. *Sci. Tot. Environ.*, 407: 4821–4825.

Hu, Z., Shi, Y., Niu, H., Cai, Y. (2012): Synthetic musk fragrances and heavy metals in snow samples of Beijing urban area. *China Atmos Res*, 104–105:302–5.

Ippen, H. (1994): Nitro musk. *Int. Ardt. occup. environ. Health*, 66: 283-285.

ISO 11267:2014(en). Soil quality. Inhibition of reproduction of *Collembola (Folsomia candida)* by soil contaminants.

Jardim, W. (2012): An integrated approach to evaluate emerging contaminants in drinking water. *Separation and Purification Technology.*, 84: 3-8.

JCGM (Joint Committee for Guides in Metrology), “International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM)”, 3rd edition, 2012, p. 41

JCGM 200 :2008. Vocabulario Internacional de Metrología Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados VIM. Página web consultada: 21/04/2016.
<https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.jcgm.vim.2008.pdf>

Jeon, H-K., Chung, Y. y Ryu, J-C. (2006): Simultaneous determination of benzophenone-type UV filters in water and soil by gas chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr A.*, 1131: 192–202.

Jiménez, I. , Zafra, A., Ballesteros, O. , Navalón, A.. (2014): Analytical methods for the determination of personal care products in human samples: An overview. *Talanta*, 129: 448–458.

Jossa, A., Kellera, E., Aldera, A.C., Goebel, A.. (2005): Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment. *Water Research*, 39: 3139–3152.

Jurado, J.M. (2008): Aplicación de Microsoft Excel a la Química Analítica: validación de métodos analíticos. Página web consultada: 22/04/2016.
<http://personal.us.es/jmjurado/docs/AQAEXCEL.pdf>

Kafferlein, H., Angerer, J. (1999): Musk Xylene - is it still of relevance in Environmental Medicine [Abstract]. *Umweltmed Forsch Prax*, 4(4):204–205.

Kang, C.S., Lee, J.H., Kim, S.K., Lee, K.T., Lee, J.S., Park, P.S., Yun, S.H., Kannan, K., Yoo, Y.W., Ha, J.Y., Lee, S.W. (2010): Polybrominated diphenyl ethers and synthetic musks in umbilical cord serum, maternal serum, and breast milk from Seoul, South Korea. *Chemosphere*, 80: 116–122.

Kannan, K., Reiner, J.L., Yu, S.H., Perrotta, E.E., Tao, L., Johnson-Restrepo, B., Rodan, B. D. (2005): Polycyclic musk compounds in higher trophic level aquatic organisms and humans from the United States. *Chemosphere*, 61: 693–700.

Kaštelan-macan, M. (2007): Water resources and waste water management in Bosnia and Herzegovina, Croatia and the State Union of Serbia and Montenegro. *Water Policy*, 9: 319-43.

Kevekordes, S., Grahl, K., Zaulig, A., Dunkelberg, H. (1996): Optimization of a Sensitive Method for the Determination of Nitro Musk Fragrances in Waters by Solid-Phase Microextractions and Gas Chromatography with Micro Electron Capture Detection using Factorial Experimental Design. *Environ Sci Pollut Res Int*, 3(4):189–192.

Kevekordes, S., Zaulig, A., Dunkelberg, H. (1997): Genotoxicity of nitro musks in the micronucleus test with human lymphocytes in vitro and the human hepatoma cell line Hep G2. *Toxicol Lett*, 91(1):13–17.

Klepka, S. (1997a): Effects of AHTN on reproduction of the springtail *Folsomia candida* in artificial soil. Report to RIFM, IBACON Project no. 1781016.

Klepka, S. (1997b): Effects of HHCB on reproduction of the springtail *Folsomia candida* in artificial soil. Report to RIFM, IBACON Project no. 2031016.

Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.T. (2002): Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999–2000: a national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1202–1211.

Kümmerer, K. (2001): Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources da review. *Chemosphere*, 45: 957-969.

Kupper, T., Berset, J.D., Etter-Holzer, R., Furrer, R., Tarradellas, J. (2004): Concentrations and specific loads of polycyclic musks in sewage sludge originating from a monitoring network in Switzerland. *Chemosphere* 54, 1111–1120.

Kupper, T., Plagellat, C., Brañndli, R.C., Alencastro, L.F., Grandjean, D., Tarradellas, J. (2006): Fate and removal of polycyclic musks, UV filters and biocides during wastewater treatment. *Water Research*, 40: 2603 – 2612.

Lange, C., Kuch, B., Metzger, J.W. (2014): Occurrence and fate of synthetic musk fragrances in a small German river. *J Hazard Mater*, 282: 34-40.
<http://worldwidescience.org/topicpages/s/synthetic+musk+fragrances.html>

Lapworth, D. J. (2012): Emerging organic contaminants in groundwater: a review of sources, fate and occurrence. *Environ Pollut*, 163: 287–303.

Lee, I.S., Kim, U.J., Oh, J.E., Choi, M., Hwang, D.W. (2014): Comprehensive monitoring of synthetic musk compounds from freshwater to coastal environments in Korea: with consideration of ecological concerns and bioaccumulation. *Sci Total Environ.* 1;470-471.

Lee, I.S., Lee, S.H., Oh, J.E. (2010): Occurrence and fate of synthetic musk compounds in water environment. *Water Res.*, 44: 214–222.

Lignell, S., Darnerud, P.O., Aune, M., Cnattingius, S., Hajslova, J., Setkova, L., Glynn, A. (2008): Temporal trends of synthetic musk compounds in mother's milk and associations with personal use of perfumed products. *Environ Sci Technol*, 42(17):6743–6748.

Lindström, A. (2002): Occurrence and environmental behavior of the bactericide triclosan and its methyl derivative in surface waters and in wastewater. *Environmental science & technology.*, 36 (1): 2322-2329.

Liu, S., Zhou, Q., Wang, Y. (2011), Ecotoxicological responses of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to soil contaminated with HHCB. *Chemosphere*, 83: 1080–1086.

Litz, N.T., Muller, J., Bohmer, W. (2007): Occurrence of Polycyclic Musks in Sewage Sludge and their Behaviour in Soils and Plants. Part 2: Investigation of Polycyclic Musks in Soils and Plants. *J. Soil Sediments*, 7(2): 36–44.

Llompert, M., Celeiro, M., Pablo Lamas, J., Sanchez-Prado, L., Lores, M., Garcia-Jares, C. (2013): Analysis of plasticizers and synthetic musks in cosmetic and personal care products by matrix solid-phase dispersion gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1293: 10–19.

López, M., Chisvert, A., Salvador, a., Carretero, A. (2011): Dispersive liquid–liquid microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry for the determination of nitro musks in surface water and wastewater samples. *Talanta*, 85: 1990– 1995

Lu, Y., Yuan, T., Wang, W., Kannan, K., (2011): Concentrations and assessment of exposure to siloxanes and synthetic musks in personal care products from China. *Environ. Pollut.*, 159: 3522–3528.

Lu, Y., Yuan, T., Yun, S.H., Wang, W., Kannan, K. (2011): Occurrence of synthetic musks in indoor dust from China and implications for human exposure. *Arch Environ Contam Toxicol*, 60(1):182–189.

Luckenbach, T., Epel, D. (2005): Nitromusk and polycyclic musk compounds as long-term inhibitors of cellular xenobiotic defense systems mediated by multidrug transporters. *Environ Health Perspect*, 113(1):17–24.

Maekawa, A., Matsushima, Y., Onodera, H., Shibutani, M., Ogasawara, H., Kodama, Y., Kurokawa, Y., Hayashi, Y. (1990): Long-term toxicity/carcinogenicity of musk xylol in B6C3F1 mice. *Food Chem Toxicol*, 28(8):581–586.

Mahugo, C., Sosa, Z., Torres, M., Santana, J. (2009): Methodologies for the extraction of phenolic compounds from environmental samples: New approaches. *Molecules*, 14: 298-320.

Manual 3700 FR/3720 Refrigerated sampler. Installation and operation guide. (1997): Teledyne ISCO.

Martín, J. (2012): Análisis y dinámica de principios activos farmacológicos en lodos de depuradora. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla, 179-224.

Martínez, M.J., Gomez, M.J., Herrera, S., Hernando, M.D., Agüera, A. (2012): Occurrence and persistence of organic emerging contaminants and priority pollutants in five sewage treatment plants of Spain: Two years pilot survey monitoring. *Environmental Pollution* 164, 267-273.

Matamoros, V., Calderon, D., Dominguez, C., Bayona, J.M. (2012): Analytical procedures for the determination of emerging organic contaminants in plant material: A review. *Analytica Chimica Acta*, 722: 8– 20.

Matamoros, V., Gutiérrez, R., Ferrer, I., García, J., Bayona, J.M. (2015): Capability of microalgae-based wastewater treatment systems to remove emerging organic contaminants: A pilot-scale study *Journal of Hazardous Materials*, 288: 34–42.

Mercier, F., Gilles, E., Saramitoa, G., Glorennec, P., Bot, B. (2014): A multi-residue method for the simultaneous analysis in indoor dust of several classes of semi-volatile organic compounds by pressurized liquid extraction and gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1336: 101–111.

Mersch-Sundermann, V., Emig, M., Reinhardt, A. (1996): Nitro musks are cogenotoxicants by inducing toxifying enzymes in the rat. *Mutat Res*, 356(2):237–245.

Mitjans, D., Ventura, F. (2005): Determination of fragrances at ng/L levels using CLSA and GC/MS detection. *Water Sci Technol*, 52 (10–11):145–50.

Moran, M. J., Zogorski, J. S. y Squillace, P. J. (2006): Chlorinated solvents in groundwater of the United States. *Environ Sci Technol.*, 41: 74–81.

Mullerova, D., Kopecky, J. (2007): White adipose tissue: storage and effector site for environmental pollutants. *Physiol Res*, 56(4):375–381.

Nakata, H., Hinosaka, M., Yanagimoto, H. (2015): Macrocyclic-, polycyclic-, and nitro musks in cosmetics, household commodities and indoor dusts collected from Japan: implications for their human exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 111: 248–255.

Nakata, H., Sasaki, H., Takemura, A., Yoshioka, M., Tanabe, S., & Kannan, K. (2007): Bioaccumulation, temporal trend, and geographical distribution of synthetic musks in the marine environment. *Environmental Science and Technology*, 41, 2216–2222.

Nakata, H., Shinohara, R., Nakazawa, Y., Isobe, T., Sudaryanto, A., Subramanian, A., Tanabe, S., Zakaria, M.P., Zheng, G.J., Lam, P.K., Kim, E.Y., Min, B.Y., We, S.U., Viet, P.H., Tana, T.S., Prudente, M., Frank, D., Lauenstein, G., Kannan, K. (2011): Asia-Pacific mussel watch for emerging pollutants: Distribution of synthetic musks and benzotriazole UV stabilizers in Asian and US coastal waters. *Mar Pollut Bull.*, 64 (10): 2211-8.

Obón de Castro, J.M. Análisis microbiológico del agua. Dpto. Ingeniería Química y Ambiental Universidad Politécnica de Cartagena. Pagina web (consultada 14/04/2016). http://www.upct.es/~minaeees/analisis_microbiologico_aguas.pdf

OMS, Organización Mundial de la Salud. Página web: <http://www.who.int/es/> (Página web visitada: 12/03/2016).

Ortega, E., Ferrer, Y., Salas, J., Aragón, C., Real, A.(2010): Manual para la implantación de sistemas de depuración en pequeñas poblaciones. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.

Osemwengiea, L., Steinberg, S. (2001): On-site solid-phase extraction and laboratory analysis of ultra-trace synthetic musks in municipal sewage effluent using gas chromatography–mass spectrometry in the full-scan mode. *Journal of Chromatography A*, 932: 107–118.

OSPAR Commission 2004. Hazardous Substances Series. OSPAR background document on musk xylene and other musks. <http://www.ospar.org/documents?v=6978> (Página web visitada: 24/02/2016).

OSPAR Commission (2004): OSPAR Background Document on Musk Xylene and Other Musks. London: OSPAR Commission; 2004. (Página web consultada: 26/02/2016) <http://www.ospar.org/documents?v=6978>

OSPAR List of Chemicals for Priority Action (Update 2006) (Reference number 2001-12) OSPAR 04/23/1-E Annex 7. (Página web visitada : 11/05/201). http://www.ospar.org/documents/dbase/decrecs/agreements/04-12e_List%20of%20Chemicals%20for%20Priority%20action.doc

Página web consultada 26/05/2015. http://docsetools.com/articulos-utiles/article_123617.html.

Pal, A. (2010): Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: review of recent occurrences, sources, fate and effects. *Sci Total Environ.*, 408: 6062–6069.

Parker, R.D., Buehler, E.V., Newmann, E.A. (1986): Phototoxicity, photoallergy, and contact sensitization of nitro musk perfume raw materials., *Contact Dermatitis*, 14(2):103-9.

Posada, O., Olivares, M., Navarro, P., Vallejo, A., Zuloaga, O., Etxebarria, N. (2012): Membrane assisted solvent extraction coupled to large volume injection-gas chromatography–mass spectrometry for trace analysis of synthetic musks. *Journal of Chromatography A*, 1227: 38– 47.

Parolini, M., Magni, S., Traversi, I., Villa, S., Finizio, A., Binelli, A. (2015): Environmentally relevant concentrations of galaxolide (HHCB) and tonalide (AHTN) induced oxidative and genetic damage in *Dreissena polymorpha*. *Journal of Hazardous Materials*, 285: 1–10.

Pawliszyn, J. (1997): *Solid phase microextraction: Theory and practice*. New York. Willey-VCH, 247p.

Pawliszyn, J., Chen, Y. (2004): Solid-Phase Microextraction Field Sampler. *Anal. Chim Acta*, 76: 6823-6828.

Peck, A.M., Hornbuckle, K.C. (2004): Synthetic musk fragrances in Lake Michigan. *Environ Sci Technol*, 38(2):367–372.

Peck, A.M., Hornbuckle, K.C. (2006): Aquatic processes and systems in perspective. *J Environ Monit*, 8(9):874–879.

Petron Industry News. Analytical Instrumentation: GC/MS with Extended Dynamic Range (EDR) Technology – Quantifying VOC's in Gasoline. Pagina web consultada (01/09/2015). https://www.petro-online.com/news/analytical-instrumentation/11/bruker_chemical_applied_markets/gcms_with_extended_dynamic_range_edr_technology_quantifying_voc39s_in_gasoline/29609/.

Picot, M., Martinez, M.J., Rosain, D., Fenet, H., Casellas, C., Pereira, C., Maria, V., Bebianno, M.J., Gomez, E. (2014): Detection of emerging contaminants (UV filters, UV stabilizers and musks) in marine mussels from Portuguese coast by QuEChERS extraction and GC–MS/MS. *Sci. Total Environ.*, 493: 162–169.

Poynton, H. C. y Vulpe, C. D. (2009): Ecotoxicogenomics: Emerging Technologies for Emerging Contaminants. *Journal of the American Water Resources Association.*,45: 83–96.

Procedimiento General en EFS. Pagina web consultada (01/09/2015). http://www.cromlab.es/EFS_Principal.htm

Qinghua, Z. (1993): China's perfumery industry picks up. *Perfum. Flavor.*, 18: 47-48.
Ramskov, T., Selck, H., Salvito, D. and Forbes, V. (2009): Individual- and population-level effects of the synthetic musk, HHCB, on the deposit-feeding polychaete, *Capitella* sp. I. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28 (12): 2695–2705.

Real Decreto 60/2011, de 21 de enero, sobre las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas.

REACH-CLP, portal de información. Páginas web (consultada 06/03/2016). <http://www.portalreach.info/category/legislacion/>

Real Decreto legislativo 1/2001, de 20 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Aguas.

Reemtsma, T., Weiss, S., Mueller, J., Petrovic, M., Gonzalez, S., Barcelo, D., Ventura, F., Knepper, T.P. (2006): Polar pollutants entry into the water cycle by municipal wastewater: a European perspective. *Environ Sci Technol*, 40(17):5451–5458.

Reglamento (CE) No 1907/2006 del Parlamento Europeo y del consejo de 18 de diciembre de 2006, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH), por el que se crea la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2006R1907:20130701:ES:PDF>. Páginas web (consultada 06/03/2016).

Reglamento (UE) nº 895/2014 de la Comisión, de 14 de agosto de 2014, por el que se modifica el anexo XIV del Reglamento (CE) nº 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y mezclas químicas (REACH).

Reif, R., Suárez, S., Omil, F., Lema, J.M. (2008): Fate of pharmaceuticals and cosmetic ingredients during the operation of a MBR treating sewage. *Desalination*, 221: 511–517.

Reiner, J.L., Kannan, K. (2006): A survey of polycyclic musks in selected household commodities from the United States. *Chemosphere*, 62: 867–873.

Reyes, C., Matamoros, V., Ruiz, I., Soto, M., Bayona, J.M. (2011): Evaluation of PPCPs removal in a combined anaerobic digester-constructed wetland pilot plant treating urban wastewater. *Chemosphere*, 84: 1200–1207.

Richardson, M. L., Bowron, J. M. (1985): The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. *J Pharm Pharmacol.*, 37: 1-12.

Ricking, M., Schwarzbauer, J., Hellou, J., Svenson, A., Zitko, V. (2003): Polycyclic aromatic musk compounds in sewage treatment plant effluents of Canada and Sweden—first results. *Marine Pollution Bulletin*, 46: 410–417.

Riedel, J., Dekant, W. (1999): Biotransformation and toxicokinetics of musk xylene in humans. *Toxicol Appl Pharmacol*, 157(2):145–155.

Rimkus, G. (1999): Polycyclic musk fragrances in the aquatic environment. *Toxicol. Lett.*, 111: 37–56.

Rimkus, G.G., (1995) Wolf M: Nitro musk fragrances in biota from freshwater and marine environment. *Chemosphere*, 30(4):641–651.

Rimkus, G., Wolf, M. (1993): Rückstände und Verunreinigungen in Fischen aus Aquakultur. 2. Mitteilung: Nachweis von Moschus Xylol und Moschus Keton im Fischen. *Deut. Lebensm.-Rundsch.*, 89: 171–175.

Rimkus, G.G., Wolf, M. (1995): Nitro musk fragrances in biota from freshwater and marine environment. *Chemosphere*, 30(4): 641–651.

Robustez, <http://www.uvg.edu.gt/DQF/Estadistica-UVG2015/ROBUSTEZ.pdf>. Pagina web consultada 21/02/2016

Rodríguez-Prieto, L. (2012): Treatment of emerging contaminants in wastewater treatment plants (WWTP) effluents by solar photocatalysis using low TiO₂ concentrations. *Journal of Hazardous Materials.*, 211-212: 131-137.

Roosens, L., Covaci, A., Neels, H. (2007): Concentrations of synthetic musk compounds in personal care and sanitation products and human exposure profiles through dermal application. *Chemosphere*, 69(10): 1540–1547.

Ros, O., Izaguirre, J., Olivares, M., Bizarro, C., Ortiz-Zarragoitia, M., Cajaraville, M.P., Etxebarria, N., Prieto, A., Vallejo, A. (2015): Determination of endocrine disrupting compounds and their metabolites in fish bile *Science of the Total Environment*, 536: 261–267.

Rüdel, H., Böhmer, W., & Schröter-Kermanib, C. (2006): Retrospective monitoring of synthetic musk compounds in aquatic biota from German rivers and coastal areas. *Journal of Environmental Monitoring*, 8, 812–823.

Sanchez-Prado, L., Llompart, M., Lamas, J.P., Garcia-Jares, C., Lores, M. (2011): Multicomponent analytical methodology to control phthalates, synthetic musks, fragrance allergens and preservatives in perfumes. *Talanta*, 85: 370–379.

SANCO/10684/2009. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Pagina web consultada el 22/02/2016. http://www.crl-pesticides.eu/library/docs/allcrl/AqcGuidance_Sanco_2009_10684.pdf

SANTE/11945/2015. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed.

SCCNFP/0609/02. (2002): Opinion of the Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products (SCCNFP) intended for consumers concerning 6-Acetyl-1,1,2,4,4,7-hexamethyltetraline (AHTN). (Página web visitada : 24/02/2016) http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/sccp/documents/out176_en.pdf

Schmeiser, H.H., Gminski, R., Mersch-Sundermann, V. (2001): Evaluation of health risks caused by musk ketone. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 203: 293–299.

Schnell, S., Martin-Skilton, R., Fernandes, D., Porte, C.(2009): “The interference of nitro- and polycyclic musks with endogenous and xenobiotic metabolizing enzymes in carp: An in-vitro study.” *Environmental Science Technology*, 43: 9458-9464.

Seiler, R. (1999): Caffeine and pharmaceuticals as indicators of waste water contamination in wells. *Ground Water*. 37: 405-410.

Serna, W., Peñuela, G., López, C. (2012): Estimación de la incertidumbre en la medición de hidrocarburos aromáticos en el análisis de muestras de agua por microextracción en fase sólida automático y cromatografía de gases con detección selectiva de masas. *Revista Politécnica* 8(15): 37-44.

Shin-Fang, W., Li-Lian, L., Wang-Hsien, D. (2012): One-step microwave-assisted headspace solid-phase microextraction for the rapid determination of synthetic polycyclic musks in oyster by gas chromatography–mass spectrometry. *Food Chemistry* 133, 513–517.

Sofuoglu, A., Kiyemet, N., Kavcar, P., Sofuoglu, S.C. (2010): Polycyclic and nitro musks in indoor air: a primary school classroom and a women's sport center. *Indoor Air*, 20(6):515–522.

Snow, N. (2000): Solid-phase micro-extraction of drugs from biological matrices. *J.Chromatogr. A.*, 885: 445-455.

Spencer, P.S., Bischoff-Fenton, M.C., Moreno, O.M., Opdyke, D.L., Ford, R.A. (1984): Neurotoxic properties of musk ambrette. *Toxicol Appl Pharmacol*, 75(3): 571–575.

Stack, M., Fitzgerald, G., O’Connell, S., James, K. (2000): Measurement of trihalomethanes in potable and recreational waters using solid phase micro extraction with gas chromatographymass spectrometry. *Chemosphere*, 41: 1821-1826.

Stuart, M.(2012): Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. *Science of the Total Environment.*, 416: 21.

Suarez, S., Lema, J.M., Omil, F. (2009): Pre-treatment of hospital wastewater by coagulation–flocculation and flotation. *Bioresource Technology*, 100: 2138–2146.

Sun, P., Casteel, K., Dai. H., Wehmeyer, K.R., Kiel, B., Federle, T. (2014): Distributions of polycyclic musk fragrance in wastewater treatment plant (WWTP)

effluents and sludges in the United States. *Science of the Total Environment*, 493: 1073–1078.

Swartz, C.(2006): Steroid estrogens, nonylphenoethoxylate metabolites, and other wastewater contaminants in groundwater affected by a residential septic system on Cape Cod, MA. *Environmental Science and Technology*., 40: 4894-4902.

Taylor, K.M., Weisskopf, M. and Shine, J. (2014): Human exposure to nitro musks and the evaluation of their potential toxicity: an overview. *Environmental Health*, 13:14. (Página web consultada: 26/02/2016) <http://www.ehjournal.net/content/13/1/14>

Teijon, G. (2010): Occurrence of emerging contaminants, priority substances (2008/105/ CE) and heavy metals in treated wastewater and groundwater at Depurbaix facility (Barcelona, Spain). *Science of the Total Environment*., 408: 3584-3595.

Ternes, T.A., Bonerz, M., Herrmann, N., Teiser, B., Andersen, H.R. (2007): Irrigation of treated wastewater in Braunschweig, Germany: An option to remove pharmaceuticals and musk fragrances. *Chemosphere*, 66: 894–904.

Ternes, T.A. (1998): Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Res.* 32, 3245–3260.

Ternes, T.A., Stubera, J., Herrmann, N., McDowell, D. (2003): Ozonation: a tool for removal of pharmaceuticals, contrast media and musk fragrances from wastewater. *Water Research*, 37: 1976–1982.

Ternes, T., Herrmann, N., Bonerz, M., Knacker, T., Siegrist, H., Joss, A. (2004): A rapid method to measure the solid–water distribution coefficient (K_d) for pharmaceuticals and musk fragrances in sewage sludge. *Water Research* 38: 4075–4084.

Terzić, S., Sentaa, I., Ahela, M.A., Grosb, M., Petrović, M. (2008): Occurrence and fate of emerging wastewater contaminants in Western Balkan Region. *Science of the Total Environment*, 399: 66-77.

Trabalón, L., Cano-Sancho, G., Pocurull, E., Nadal, M., Domingo, J.L., Borrull, F. (2015): Exposure of the population of Catalonia (Spain) to musk fragrances through seafood consumption: Risk assessment. *Environ Res.* (Página web 26/02/2016). <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013935115001243>

Trenholm, R., Vanderford, B., Drewes, J., Snyder, S.(2008): Determination of household chemicals using gas chromatography and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1190: 253–262.

Truu, M., Juhanson, J., Truu, J. (2009): Microbial biomass, activity and community composition in constructed wetlands. *Sci. Total Environ.*, 407: 3958–3971.

UNE-EN 872:2006. Calidad del agua. Determinación de los sólidos en suspensión. Método de filtración por filtro de fibra de vidrio.

UNE-EN 903:1994. Calidad del agua. Determinación de agentes aniónicos de superficie por medición del índice de azul de metileno SAAM. (ISO 7875-1:1984, modificada). (Versión oficial EN 903:1993).

UNE-EN 1189:1997. Calidad del agua. Determinación del fósforo. Método espectrométrico con molibdato amónico.

UNE-EN 1622:2007. Calidad del agua. Determinación del umbral de olor (TON) y del umbral de sabor (TFN)

UNE-EN 1899-1:1998. Calidad del agua. Determinación de la demanda bioquímica de oxígeno después de n días (DBOn). Parte 1: Método de dilución y siembra con adición de alil tiourea.

UNE-EN 1899-2:1998. Calidad del agua. Determinación de la demanda bioquímica de oxígeno después de n días (DBOn). Parte 2: Método para muestras no diluidas.

UNE-EN ISO 5814:2013. Calidad del agua. Determinación del oxígeno disuelto. Método electroquímico con sonda. (ISO 5814:2012).

UNE-ISO 6059:2014. Calidad del agua. Determinación de la suma de calcio y magnesio. Método volumétrico con AEDT.

UNE-EN ISO 6341:2013. Calidad de agua. Determinación de la inhibición de la movilidad de *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). Ensayo de toxicidad aguda. (ISO 6341:2012).

UNE-ISO 6439:2013. Calidad del agua. Determinación del índice de fenol. Método espectrométrico de la 4-aminoantipirina después de la destilación.

UNE-EN ISO 6878:2005. Calidad del agua. Determinación del fósforo. Método espectrométrico de molibdato de amonio. (ISO 6878:2004).

UNE-EN ISO 7027:2001. Calidad del agua. Determinación de la turbiedad. (ISO 7027:1999).

UNE-EN ISO 7346-1:1998. Calidad del agua. Determinación de la toxicidad letal aguda de sustancias frente a un pez de agua dulce [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]. Parte 1: Método estático. (ISO 7346-1:1996).

UNE-EN ISO 7346-2:1998. Calidad del agua. Determinación de la toxicidad letal aguda de sustancias frente a un pez de agua dulce [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]. Parte 2: Método semiestático. (ISO 7346-2:1996).

UNE-EN ISO 7346-3:1998. Calidad del agua. Determinación de la toxicidad letal aguda de sustancias frente a un pez de agua dulce [*brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]. Parte 3: Método de flujo continuo. (ISO 7346-3:1996).

UNE-EN ISO 7393-2:2000. Calidad del agua. Determinación de cloro libre y de cloro total. Parte 2: Método colorimétrico con N,N-dietil-1,4-fenilendiamina, destinado al control de rutina. (ISO 7393-2:1985).

UNE-EN ISO 7887:2012. Calidad del agua. Examen y determinación del color (ISO 7887:2011).

UNE-EN ISO 7899-2:2001. Calidad del agua. Detección y recuento de enterococos intestinales. Parte 2: Método de filtración de membrana. (ISO 7899-2:2000)

UNE-EN ISO 8192:2007. Calidad del agua. Ensayo de inhibición del consumo de oxígeno por lodos activados por oxidación del carbono y del amonio. (ISO 8192:2007).

UNE-EN ISO 8199:2008. Calidad del agua. Orientaciones generales para el recuento de microorganismos en cultivo. (ISO 8199:2005).

UNE-EN ISO 9000 (2005), Sistema de gestión de calidad. Fundamentos y vocabulario.

UNE-ISO 9297:2013. Calidad del agua. Determinación de cloruros. Valoración de nitrato de plata con cromato como indicador (Método de Mohr).

UNE-EN ISO 9308-1:2014 Calidad del agua. Recuento de *Escherichia coli* y de bacterias coliformes. Parte 1: Método de filtración por membrana para aguas con bajo contenido de microbiota. (ISO 9308-1:2014).

UNE-EN ISO 9308-2:2014 Calidad del agua. Recuento de *Escherichia coli* y bacterias coliformes. Parte 2: Método del número más probable. (ISO 9308-2:2012)

UNE-EN ISO 9377-2:2001. Calidad del agua. Determinación del índice de hidrocarburos. Parte 2: Método por extracción con disolvente y cromatografía de gases. (ISO 9377-2:2000).

UNE-EN ISO 9509:2007. Calidad del agua. Ensayo de toxicidad para la evaluación de la inhibición de la nitrificación de microorganismos de los lodos activados. (ISO 9509:2006).

UNE-EN ISO 9963-1:1996. Calidad del agua. Determinación de la alcalinidad. Parte 1: Determinación de la alcalinidad total y compuesta. (ISO 9963-1:1994).

UNE-EN ISO 9963-2:1996. Calidad del agua. Determinación de la alcalinidad. Parte 2: Determinación de la alcalinidad del carbonato (ISO 9963-2:1994).

UNE-EN ISO 10301:1998. Calidad del agua. Determinación de hidrocarburos halogenados altamente volátiles. Métodos por cromatografía de gases. (ISO 10301:1997).

UNE-EN ISO 10707:1998. Calidad del agua. Evaluación en medio acuoso de la biodegradabilidad aerobia "final" de compuestos orgánicos. Método por análisis de la demanda bioquímica de oxígeno (ensayo en recipientes cerrados).

UNE-EN ISO 10712:1996. Calidad del agua. Ensayo de inhibición del crecimiento de las *Pseudomonas putida* (Ensayo de inhibición de la multiplicación celular en *Pseudomonas*). (ISO 10712:1995).

UNE-EN ISO 11885:2010. Calidad del agua. Determinación de elementos seleccionados por espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) (ISO 11885:2007).

UNE-EN 12393-2:2014. Alimentos de origen vegetal. Métodos multiresiduos para la determinación mediante cromatografía de gases o LC-MS/MS de los residuos de plaguicidas. Parte 2: Métodos por extracción y lavado.

UNE-EN ISO 13395:1997. Calidad del agua. Determinación de nitrito y nitrato y la suma de ambos por análisis por inyección de flujo (CFA y FIA) con detección espectrométrica. (ISO 13395:1996).

UNE-EN 1484:1998. Análisis del agua. Directrices para la determinación del carbono orgánico total (COT) y del carbono orgánico disuelto (COD).

UNE-EN 15041:2015. Productos químicos utilizados en el tratamiento del agua destinada al consumo humano. Productos antiincrustantes para membranas. Polifosfatos.

UNE-EN 15637:2009. Alimentos de origen vegetal. Determinación de residuos de plaguicidas utilizando LC-MS/MS seguido de extracción con metanol y lavado utilizando tierras diatomeas.

UNE-EN 15662:2009. Alimentos de origen vegetal. Determinación de residuos de plaguicidas utilizando GC-MS y/o LC-MS /MS seguido de extracción/división de acetonitrilo y método de purificación dispersiva SPE-QuEChERS. UNE-EN 15637:2009

UNE-EN ISO 15680:2004. Calidad del agua. Determinación de ciertos hidrocarburos aromáticos monocíclicos, naftaleno y algunos compuestos clorados utilizando purga y trampa y desorción térmica. (ISO 15680:2003)

UNE-EN 16691:2016. Calidad del agua. Determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) seleccionados en muestras de agua total. Método por extracción en fase sólida (SPE) con discos SPE combinada con cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM).

UNE-EN ISO 16712:2007. Calidad del agua. Determinación de la toxicidad aguda de los sedimentos marinos y de estuarios para los anfípodos. (ISO 16712:2005).

UNE-EN ISO/IEC 17025:2005. Criterios generales para la acreditación de laboratorios de ensayo y calibración.

UNE-EN ISO 17294-1:2007. Calidad del agua. Aplicación de la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). Parte 1: Directrices generales. (ISO 17294-1:2004).

UNE-EN ISO 17294-2:2005. Calidad del agua. Aplicación de la técnica combinada de plasma acoplado inductivamente y espectrometría de masas (ICP-MS). Parte 2: Determinación de 62 elementos (ISO 17294-2:2003).

UNE-EN ISO 17993:2004. Calidad del agua. Determinación de 15 hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) en agua mediante HPLC con detección por fluorescencia tras extracción líquido-líquido (ISO 17993:2002).

UNE-EN ISO 21427-2:2009. Calidad del agua. Evaluación de la genotoxicidad mediante la medida de la inducción de micronúcleos. Parte 2: Método de la población mezclada utilizando la línea celular V79. (ISO 21427-2:2006).

UNE-EN 25663:1994. Calidad del agua. Determinación del nitrógeno kjeldahl. Método de mineralización con selenio. (ISO 5663:1984). (Versión oficial EN 25663:1993).

UNE-EN 25813:1994. Calidad del agua. Determinación del oxígeno disuelto. Método yodométrico. (ISO 5813:1983). (Versión oficial EN 25813:1992).

UNE-EN 26777:1994. Calidad del agua. Determinación de nitrito. Método de espectrofotometría de absorción molecular. (ISO 6777:1984). (Versión oficial EN 26777:1993).

UNE-EN 27888:1994. Calidad del agua. Determinación de la conductividad eléctrica. (ISO 7888:1985). (Versión oficial EN 27888:1993).

UNE 77004:2002. Calidad del agua. Determinación de la demanda química de oxígeno (DQO). Método del dicromato.

UNE 77027:1982. Métodos de análisis de aguas industriales. nitratos.

UNE 77028:2002. Calidad del agua. Determinación de nitrógeno amoniacal. Método por destilación y valoración o colorimetría.

UNE 77030:2015. Calidad del agua. Determinación del residuo total.

UNE 77032:2015. Calidad del agua. Determinación de los sólidos decantables.

UNE 77037:1983. Método de análisis de agua en vertidos industriales. Determinación de aceite y grasa, total recuperable. Método de extracción de soxhlet

UNE 77038:1983. Métodos de análisis de aguas en vertidos industriales. Aceite y grasa total, recuperable. Método de extracción con embudo de separación.

UNE 77042:2015. Calidad del agua. Determinación de cloruros. Método potenciométrico

UNE 77056:1983. Métodos de análisis de agua en vertidos industriales. Determinación de metales. Método de absorción atómica.

Vallecillos, L., Borrull, F., Pocurull, E. (2015): Recent approaches for the determination of synthetic musk fragrances in environmental samples. *Trends in Analytical Chemistry*, 72: 80–92.

Vallecillos, L., Pocurull, E., Borrull, F. (2015) Influence of pre-treatment process on matrix effect for the determination of musk fragrances in fish and mussel. *Talanta*, 8:134-690.

Van-Stempvoort, D. R. (2011): Artificial sweeteners as potential tracers in groundwater in urban environments. *J Hydrol.*, 401(1-2): 126-133.

Verbruggen E.S.D, Van, P., Schwarz-Schulz, B., Olsson, H., Paya, A. (2008): PBT Assessment of 5-Tert-Butyl-2,4,6-Trinitro-M-Xylene (Musk Xylene) Addendum to the Final Risk Assessment Report. In JRC Technical and Scientific Reports. Edited by Anklam E. Ispra (VARESE).

Verliefde, A. (2007): Priority organic micropollutants in water sources in Flanders and the Netherlands and assessment of removal possibilities with nanofiltration. *Environ Pollut.*, 146: 281–289.

Verbić, T., Dorkó, Z. and Horvai, G. (2013): Selectivity in analytical chemistry. *Rev. Roum. Chim.*, 58(7-8): 569-575.

Vessman, J., Stefan, R., Staden, J., Danzer, K., Lindner, W., Burns, D., Fajgelj, A. and Müller, H. (2001): Selectivity in analytical chemistry (IUPAC Recommendations 2001). *Pure Appl. Chem.*, 73(8): 1381-1386.

Villa, S., Assi, L., Ippolito, A., Bonfanti, P., Finizio, A. (2012): First evidences of the occurrence of polycyclic synthetic musk fragrances in surface water systems in Italy: spatial and temporal trends in the Molgora River (Lombardia Region, Northern Italy). *Sci. Total Environ.*, 416: 137–141.

Villa, S., Vighi, M., Finizio, A. (2014): Theoretical and experimental evidences of medium range atmospheric transport processes of polycyclic musk fragrances. *Science of the Total Environment* 481, 27–34.

Wang, X., Liu, Z., Wang, W., Zhang, C., Chen, L. (2015). Derivation of predicted no effect concentration (PNEC) for HHCb to terrestrial species (plants and invertebrates). *Science of the Total Environment*, 508: 122–127.

Wang, H., Zhang, J., Gao, F., Yang, Y., Duan, H., Wu, Y., Berset, J.D., Shao, B. (2011): Simultaneous analysis of synthetic musks and triclosan in human breast milk by gas chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, 879(21):1861–1869.

Watanabe, N. (2010): Use and environmental occurrence of antibiotics in freestall dairy farms with manure forage fields. *Environmental Science and Technology.*, 44: 6591-6600.

Whiteman, G., Krug, B. (2008): Beauty and beast: consumer stakeholders demand action in China. *J Int Bus Ethics*, 1(1):36–51.

WHO. (1990): IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Geneva: World Health Organization. (Página web visitada : 24/02/2016) <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol50/mono50.pdf>.

Yamagishi, T., Miyazaki, T., Horii, S., Akiyama, K. (1983): Synthetic musk residues in biota and water from Tama River and Tokyo Bay (Japan). *Arch Environ Contam Toxicol*, 12(1):83–89.

Yamagishi, T., Miyazaki, T., Horii, S., Kaneko, S. (1981). Identification of musk xylene and musk ketone in freshwater fish collected from the Tama river, Tokyo. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, 26: 656–662.

Yan, L., Tao, Y., Jiangyong, H., Wenhua, W. (2010): Seasonal occurrence and behavior of synthetic musks (SMs) during wastewater treatment process in Shanghai, China. *Science of the Total Environment*, 408: 4170–4176.

Yang, J.J., Metcalfe, C. (2006): Fate of synthetic musks in a domestic wastewater treatment plant and in an agricultural field amended with biosolids. *Science of the Total Environment*, 363: 149– 165.

Yao, C. (2011): Selective extraction of emerging contaminants from water samples by dispersive liquid–liquid microextraction using functionalized ionic liquids. *Journal of Chromatography A.*, 1218: 1556-1566.

Yin, J., Wang, H., Zhang, J., Zhou, N., Gao, F., Wu, Y., Xiang, J., Shao, B. (2012): The occurrence of synthetic musks in human breast milk in Sichuan, China. *Chemosphere*, 87: 1018–1023.

Yusa, S., Ye, X., Calafat, A. (2012): Methods for the determination of biomarkers of exposure to emerging pollutants in human Trends in Analytical Chemistry, 38:7.

Xiaonan, W., Zhengtao, L., Wanhua, W., Cong, Z. (2015) Derivation of predicted no effect concentration (PNEC) for HHCB to terrestrial species (plants and invertebrates). *Chen Science of the Total Environment*, 508: 122–127.

Xie, Z., Ebinghaus, R., Temme, C., Heemken, O., Ruck, W. (2007): Air–sea exchange fluxes of synthetic polycyclic musks in the North Sea and the Arctic. *Environ Sci Technol*, 41: 5654–9.

Zhang, X., Xu, Q., Man, S., Zeng, X., Yu, Y., Pang, Y., Sheng, G., Fu, J. (2013): Tissue concentrations, bioaccumulation, and biomagnification of synthetic musks in freshwater fish from Taihu Lake, China. *Environ Sci Pollut Res Int*, 20(1):311–322.

Zhang, X., Liang, G., Zeng, X., Zhou, J., Sheng, G., Fu, J. (2011): Levels of synthetic musk fragrances in human milk from three cities in the Yangtze River Delta in Eastern China. *J. Environ. Sci.*, 23: 983–990.

Zhang, X., Yao, Y., Zeng, X., Qian, G., Guo, Y., Wu, M., Sheng, G., Fu, J. (2008): Synthetic musks in the aquatic environment and personal care products in Shanghai, China. *Chemosphere*, 72: 1553–1558.

Zhou, J., Zeng, X., Zheng, K., Zhu, X., Ma, L., Xu, Q., Zhang, X., Yu, Y., Sheng, G., Fu, J., (2012): Musks and organochlorine pesticides in breast milk from Shanghai, China: levels, temporal trends and exposure assessment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 84: 325–333.

LISTADO DE ACRONIMOS

AHTN	Tonalide
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
APEO	Alquilfenolpolietoxilado
BHA	Hidroxianisolbutilado
BHT	Hidroxitoluenobutilado
CAR	Carboxen
CAS	Chemical Abstracts Service
CE	Conductividad eléctrica
CEM	Centro Español de metrología
CENTA	Centro Experimental de las Nuevas Tecnologías del Agua
CES	Contaminantes emergentes
CG	Cromatografía de gases
CG(ESI)MS	Cromatografía de gases -electro spray- detector de masas
CG-EI-MS	Cromatografía de gases -Impacto electrónico- detector de masas
CG-FID	Cromatografía de gases con detector de ionización de llamas
CG-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CID GAS	Gas de colisión en el segundo cuadrupolo
CITES	Convention on the International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna
CITIUS	Centro de Investigación Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla
COT	Carbono orgánico total
COV'S	Compuestos orgánicos volátiles
CRMS O MRCS	Materiales de referencias certificados
DBO	Demanda bioquímica de oxígeno
DEET	N,N-dietil-meta-toluamida
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DLLME	Microextracción líquido líquido dispersiva
DQO	Demanda química de oxígeno
DVB	Divinylbenzene
EDAR	Estación de depuración de aguas residuales
EDR	Rango dinámico extendido
EINECS	Número de registro del catálogo europeo de sustancias químicas comercializadas
ELINCS	Lista Europea de Sustancias Químicas Notificadas
FNU	Unidades nefelométricas de formacina
FS	Barrido de masas ó "Full Scan"
H	Altura equivalente de platos teóricos
HAPS O PAHS	Hidrocarburos aromáticos policíclicos

HHCB	Galaxolide
ICP-MS	Espectroscopia de emisión de plasma acoplado inductivamente con detección por espectrometría de masas
ICP-OES	Espectroscopia de emisión de plasma acoplado inductivamente con detección óptica.
IEC	Comité Electrotécnico Internacional
ISO	International Organization for Standardization
JCGM	Joint Committee for Guides in Metrology
K'	Factor de capacidad
L	Longitud de columna
LAS	Sulfonato alquilbenceno lineal
LC-MSMS	Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas/masas
LLE	Extracción líquido-líquido
LVI	Inyección de grandes volúmenes
MA	almizcle ambreta o musk ambreta
MARCADO CE	Marcado Comunidad Europea
MASE	Extracción de disolventes asistida por membrana
MIX	Mezcla de patrones
MK	Almizcle cetona o musk cetona
MM	Almizcle muscado o musk muscado
MO	Materia orgánica
MRM	Monitorización de Reacción Múltiple
MT	Almizcle tibetano o musk tibetano
MX	Almizcle xileno o musk xileno
N	número de platos teóricos
NIST	National Institute of Standards and Technology
Nº UE	Número de registro Unión Europea
OD	Oxígeno disuelto
OMS	Organización mundial de la salud
P.A.	Calidad para análisis
PBT	Sustancias persistentes, bioacumulables y tóxicas
PDMS	Polidimetilsiloxano
PEG	Polietilenglicol
PPB	µg/L
PPCP	Productos de atención farmacéutica y personal
PPM	mg/L
PPT	ng/L
PTFE	Politetrafluoroetileno
Q1	Primer cuadrupolo
Q2	Segundo cuadrupolo
Q3	Tercer cuadrupolo

REACH	Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de Sustancias Químicas
RES	Factor de resolución
RSD-TR	Desviación estándar relativa del tiempo de retención
SBSE	Extracción por adsorción sobre barra agitadora (Stir Bar Sorptive Extraction)
SCCNFP	Comité Científico sobre Productos Cosméticos y Productos No Alimentarios
SD	Sólidos disueltos
SIM	Selected ion monitoring
SPE	Extracción en fase sólida
SPME	Microextracción en fase sólida
SRM	Seguimiento de reacción seleccionada ó Product Scan
SS	Sólidos sedimentables
ST	Sólidos totales
T	Factor de asimetría
TIC	Total ion current
TM	Tiempo muerto
TR	Tiempo de retención
U	Incertidumbre
UMA	Unidad de masa atómica
UV	Ultravioleta
VIM	Vocabulario internacional de metrología
W	Valor medio de la anchura entre dos bandas
α	Factor de selectividad

ANEXO A

Gravimetric Certificate

Dr. Ehrenstorfer



Product Identification

15358500 Musk ambrette
Formula C₁₂H₁₆N₂O₅
Mol.Weight 268.28
CAS No. 83-86-9

Reference Materials for Residue Analysis

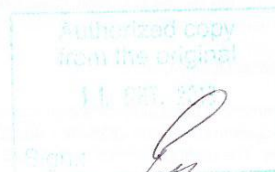
Expiry Date 23.09.2016
Lot Number 30923CY
Store at 20°C in the dark

Please note: The expiry date is valid under recommended storage conditions only.

Gravimetric Data			
Product Name	Conc. (mg/l)	Purity %	Weight (mg)
Musk ambrette	10.000	99.0	1.014
Solvent Information			
Solvent	Lot No.	Exact Quantity (ml)	
Cyclohexane	30615	100.00	
Traceability Data			
15358500 10223	neat product		
15358500 30923CY	10.000 mg/l		
Analytical Data			
Detection: GC/FID	Method Details:		
Column: DB-5, 30 m, ID 0.25 mm	Injector: 280° C		
Inj.-Vol.: 1.00 µl	Start Temperature: 60° C for 5 min		
Flow: 1.0 ml/min	End Temperature: 280° C for 1 min		
Ret.-Time: 17.71 min.	Gradient: 15° C/min		
Identity check RT			
Comment	no chromatogram available		
The uncertainty/tolerance of this standard is +/- 2.0 %, calculated in accordance with the EURACHEM/CTAC Guide - Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement - Second Edition. The uncertainty given is the expanded combined uncertainty and represents an estimated standard deviation equal to the positive square root of the total variance of the uncertainty of components. The expanded uncertainty is U which is Uc(y)*K, where K is the coverage factor at the 95% confidence level (K=2). The expanded uncertainty is based on the combination of uncertainties associated with each individual operation involved in the preparation of this product.			

Certified on 07.10.2013

by P. Feuerriegel



The Laboratory Labor Dr. Ehrenstorfer-Schäfers is accredited by DAkkS as indicated by the Accreditation Number D-RM-14174-01 has shown competence based on ISO Guide 34:2009 with relevant parts of DIN EN ISO/IEC 17025:2005 for production of certified reference materials in form of organic pure substances and in form of single and multi-component solutions organic pure substances.

Labor Dr. Ehrenstorfer-Schäfers · Bgm.-Schlosser-Str. 6 A · 86199 Augsburg · Germany
Phone +49 821 906080 · Fax +49 821 9060888 · info@analytical-standards.com
The warranty for this product is limited to the purchasing price of this product.



1. Application:

This standard solution is designed for calibration or recalibration of chromatographic systems for the determination of the specified chemical compounds concerning identity and quantification. The product can also be used as reference material for interlaboratory studies to validate analytical procedures.

2. Raw material:

All raw materials used to prepare this standard solution are of the highest purity. After our production process each material is checked by several of the following methods, if applicable: UV-, IR-Spectroscopy, Elemental analysis, chromatographical properties (GC/FID, GC/ECD, GC/MSD, HPLC/DAD, HPLC/MSD, TLC) and physical properties (phase, colour, odor, melting point) and Karl-Fischer for detection of traces of water.

3. Manufacturing:

Prior to the production for each standard solution we calculate the necessary weight of the neat material, compensate the difference of the purity of the compound to 100%. We use an electronic scale capable of weighing to 0,000001 g with a built in automatic calibration function, which is executed minimum once a week. Once a month the balance is calibrated with weights complying with the OIML-IR-20 design requirements and traceable to the national prototype of the Physikalisch-Technische Bundesanstalt, Braunschweig, the German office of weights and measurements. Every year the balance is calibrated by the manufacturer service technician. This company is also certified by the DQS following ISO9001. All steps are documented conform to ISO 9001 requirements. The single components are weighed and filled into volumetric flask (class A glassware) with the exact quantity of solvent as indicated on the certificate. Solvents are stored and handled in special rooms, which have the constant ambient temperature required from the manufacturer of the volumetric equipment. The tolerance of the weighing procedure and the dilution error adds to a maximum of +/- 1.0 %.

4. Packaging and Storage:

The final formulation was packaged in amber glass ampoules and then sealed to prevent photodegradation and evaporation. Every reference material is stored under controlled condition. One sample of each lot is kept according GLP rules to allow a recheck of the specific lot even years after the last item was sold.

5. Stability:

In regular intervals each lot is checked for stability. We guarantee the stability of the solution until the date of expiry given on the Gravimetric Certificate. In case, that the tests show a degradation within the shelf life period, the customer will be notified by Dr. Ehrenstorfer. We recommend to store the ampoules in the dark at 20° C +/- 4°C.

6. Gravimetric Certificate:

The documentation gives all the data of the production process with all the information necessary for traceability of each lot. Following GLP rules you are obliged to note the used product, lot number of the product, purity, exact weight/quantity of the product, name of the solvent, lot number of the solvent, exact quantity of the solvent, date of production, date of expiry and signature of the person in charge. Copies have to be authorized by stamp, signature of the person in charge according to your quality management handbook and date of authorization.

7. Analytical Quality Control:

The summary of the quality control procedure is documented in the separate Certificate of Analysis. Our company holds the Quality System Certificate DQS-Reg.No.:2874-01 for the standard from the ISO 9001 / EN 29000 series and the scope as specified. The audit performed by the DQS has verified, that our quality system fulfills the requirements of DIN ISO 9001.

The Laboratory Labor Dr. Ehrenstorfer-Schäfers is accredited by DAkkS as indicated by the Accreditation Number D-RM-14174-01 has shown competence based on ISO Guide 34:2009 with relevant parts of DIN EN ISO/IEC 17025:2005 for production of certified reference materials in form of organic pure substances and in form of single and multi-component solutions organic pure substances.

Labor Dr. Ehrenstorfer-Schäfers · Bgm.-Schlosser-Str. 6 A · 86199 Augsburg · Germany
Phone +49 821 906080 · Fax +49 821 9060888 · info@analytical-standards.com
The warranty for this product is limited to the purchasing price of this product.

Gravimetric Certificate

Dr. Ehrenstorfer



Product Identification

10048500 AHTN (Tonalid®)
Formula C₁₈H₂₆O
Mol.Weight 258.40
CAS No. 1506-02-1

Reference Materials for Residue Analysis

Expiry Date 23.01.2017
Lot Number 40123CY
Store at 20°C in the dark

Please note: The expiry date is valid under recommended storage conditions only.

Gravimetric Data			
Product Name		Conc. (g)	Purity %
AHTN (Tonalid®)		10.000	98.5
Weight (mg)			1.017
Solvent Information			
Solvent	Lot No.	Exact Quantity (g)	
Cyclohexane	30118	100.00	
Traceability Data			
10048500 10929	neat product		
10048500 40123CY	10.000		
Analytical Data			
Detection: GC/FID	Method Details:		
Column: DB-5, 30 m, ID 0.25 mm	Injector: 320° C		
Inj.-Vol.: 1.00 µl	Start Temperature: 120° C for 4 min		
Flow: 1.0 ml/min	End Temperature: 320° C for 3 min		
Ret.-Time: 12.85 min.	Gradient: 15° C/min		
Identity check RT			
Comment			
The uncertainty/tolerance of this standard is +/- 2.0 %, calculated in accordance with the EURACHEM/CITAC Guide - Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement - Second Edition. The uncertainty given is the expanded combined uncertainty and represents an estimated standard deviation equal to the positive square root of the total variance of the uncertainty of components. The expanded uncertainty is U which is Uc(y)*K, where K is the coverage factor at the 95% confidence level (K=2). The expanded uncertainty is based on the combination of uncertainties associated with each individual operation involved in the preparation of this product.			

Certified on 27.01.2014

by P. Feuerriegel

The Laboratory Labor Dr. Ehrenstorfer-Schäfers is accredited by DAkkS as indicated by the Accreditation Number D-RM-14174-01 has shown competence based on ISO Guide 34:2009 with relevant parts of DIN EN ISO/IEC 17025:2005 for production of certified reference materials in form of organic pure substances and in form of single and multi-component solutions organic pure substances.

Labor Dr. Ehrenstorfer-Schäfers · Bgm.-Schlosser-Str. 6 A · 86199 Augsburg · Germany
Phone +49 821 906080 · Fax +49 821 9060888 · info@analytical-standards.com
The warranty for this product is limited to the purchasing price of this product.

Data File C:\CHEM32\1\DATA\2014\KWA\2014KWA-5 2014-01-24 10-02-18\10048500-2.D
 Sample Name: 40123CY

=====

Acq. Operator : Dr. Heidrich
 Acq. Instrument : CPD20
 Injection Date : 25.01.2014 17:18:09
 Seg. Line : 38
 Location : Vial 53
 Inj. Vol. : 1 µl
 Inj. Volume : 1 µl
 Acq. Method : C:\CHEM32\1\DATA\2014\KWA-5 2014-01-24 10-02-18\10048500-2.D
 Last changed : 27.11.2012 08:20:05 by Dr. Heidrich
 Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\PAHK.M
 Last changed : 27.11.2012 08:20:05 by Dr. Heidrich
 Method Info : pahk
 Sample Info : MHW (Tonalide)

Dr. Ehrenstorfer
 Reference Materials for
 Residue Analysis

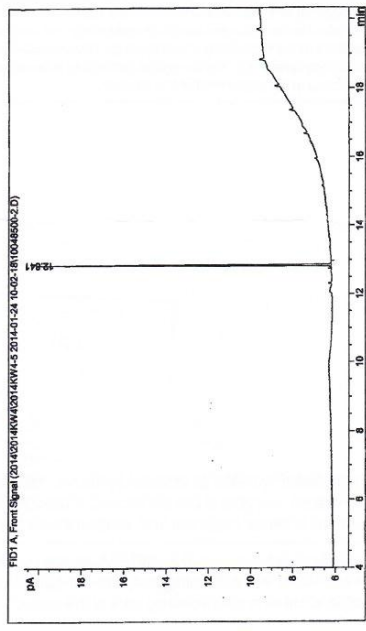
1. Application:
 This standard solution is designed for calibration or recalibration of chromatographic systems for the determination of the specified chemical compounds concerning identity and quantification. The product can also be used as reference material for laboratory studies to validate analytical procedures.

2. Raw material:
 All raw materials used to prepare this standard solution are of the highest purity. After our production process each material is checked by several of the following methods, if applicable: UV-, IR-Spectroscopy, Elemental analysis, chromatographical properties (GC/FID, GC/ECD, GC/MSD, HPLC/DAD, HPLC/MSD, TLC) and physical properties (phase, colour, odour, melting point) and Karl-Fischer for detection of traces of water.

3. Manufacturing:
 Prior to the production for each standard solution we calculate the necessary weight of the raw material, compensate the difference of the purity of the compared to 100%. We use an electronic scale capable of weighing to 0.000001 g with a built in automatic calibration function, which is executed minimum once a week. Once a month the balance is calibrated with weights complying with the OIML-JR20 design requirements and traceable to the national prototype of the Physikalisch-Technische Bundesanstalt, Braunschweig, the German office of weights and measurements. Every year the balance is calibrated by the manufacturer's service technician. This company is also certified by the DQS following ISO9001. All steps are documented conform to ISO 9001 requirements. The single components are weighed and filled into volumetric flask (class A glassware) with the exact quantity of solvent as indicated on the certificate. Solvents are stored and handled in special rooms, which have the constant ambient temperature required from the manufacturer of the volumetric equipment. The tolerance of the weighing procedure and the dilution error adds to a maximum of +/- 1.0 %.

4. Packaging and Storage:
 The final formulation was packaged in amber glass ampoules and then sealed to prevent photodegradation and evaporation. Every reference material is stored under controlled condition. One sample of each lot is kept according GLP rules to allow a recheck of the specific lot over years after the last item was sold.

5. Stability:
 In regular intervals each lot is checked for stability. We guarantee the stability of the solution until the date of expiry given on the certificate of analysis. Customers should show a signature on the ampoule at the start of the shelf life period, the customer will be notified by Dr. Ehrenstorfer. We recommend to store the ampoules in the dark at 20° C +/- 4° C.



Area Percent Report

Sorted By : Signal
 Multiplier: : 1.0000
 Dilution: : 1.0000
 Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Peak #	RetTime [min]	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	12.841	0.0243	20.46688	13.79016	1.00002
Totals :			20.46688	13.79016	

Signal 1: FID1 A, Front Signal
 *** End of Report ***

6. Gravimetric Certificate:
 The documentation gives all the data of the production process with all the information necessary for traceability of each lot. Following GLP rules you are obliged to note the used product, lot number of the product, purity, exact weight/quantity of the product, name of the solvent, lot number of the solvent, exact quantity of the solvent, date of production, date of expiry and signature of the person in charge. Copies have to be authorized by stamp, signature of the person in charge according to your quality management handbook and date of authorization.

7. Analytical Quality Control:
 The summary of the quality control procedure is documented in the separate Certificate of Analysis. Our company holds the Quality System Certificate DQS-Reg. No. 2074-01 for the standard from the ISO 9001/EN 29000 series and the scope as specified. The audit performed by the DQS has verified, that our quality system fulfills the requirements of DIN ISO 9001.

The Laboratory Labor Dr. Ehrenstorfer-Schäfers is accredited by DAkkS as indicated by the Accreditation Number D-PM-14774-01 has shown competence based on ISO Guide 34:2009 with relevant parts of DIN EN ISO/IEC 17025:2005 for production of certified reference materials in form of organic pure substances and in form of single and multi-component solutions organic pure substances.
 Labor Dr. Ehrenstorfer-Schäfers, Bism. Schäfers Str. 6 A, 86199 Augsburg, Germany
 Phone +49 821 906880; Fax +49 821 906885; info@ehrenstorfer.com
 The warranty for this product is limited to the purchasing price of this product.

Gravimetric Certificate

Dr. Ehrenstorfer



Product Identification

14213000 HHCB (Galaxolid®)
Formula C18H26O
Mol.Weight 258.40
CAS No. 1222-05-5

Reference Material for Residue Analysis

Expiry Date 08.01.2016
Lot Number 30108CY
Store at 20°C in the dark

Please note: The expiry date is valid under recommended storage conditions only.

Gravimetric Data		Conc. (mg/l)	Purity %	Weight (mg)
Product Name	HHCB (Galaxolid®)	10.000	55.8	1.797
Solvent Information		Lot No.	Exact Quantity (ml)	
Solvent	Cyclohexane	20907	100.00	
Traceability Data		neat product		
14213000 30103		10.000 mg/l		
14213000 30108CY				
Analytical Data		Method Details:		
Detection:	GC/MSD	Injector: 320° C		
Column:	DB-5, 60 m, ID 0.25 mm	Start Temperature: 120° C for 4 min		
Inj.-Vol.:	1.00 µl	End Temperature: 320° C for 5 min		
Flow:	1.0 ml/min	Gradient: 15° C/min		
Ret.-Time:	11.89 min.			
Identity check	RT, MS			
Comment	Technical Product			
The uncertainty/tolerance of this standard is +/- 10.0 %, calculated in accordance with the EURACHEM/CITAC Guide - Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement - Second Edition. The uncertainty given is the expanded combined uncertainty and represents an estimated standard deviation equal to the positive square root of the total variance of the uncertainty of components. The expanded uncertainty is U which is Uc(y)*K, w here K is the coverage factor at the 95% confidence level (K=2). The expanded uncertainty is based on the combination of uncertainties associated with each individual operation involved in the preparation of this product.				

Certified on 18.01.2013
by P. Feuerriegel

Authorized copy
from the original
21. JAN. 2013
Sign:



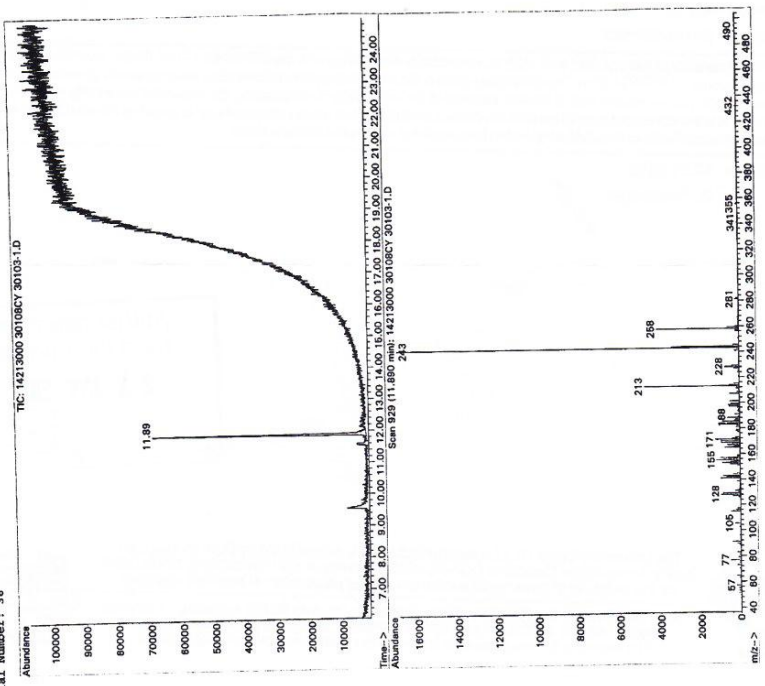
The Laboratory Labor Dr. Ehrenstorfer-Schäfers is accredited by DGA as indicated by the Accreditation Certificate DGA-PL-4536.00 based on DIN EN ISO/IEC 17025:2005 for the weighing of amounts of substances for the preparation of standard solutions.

Labor Dr. Ehrenstorfer-Schäfers · Bgm.-Schlosser-Str. 6 A · 86199 Augsburg · Germany
Phone +49 821 906080 Fax +49 821 9060888 info@analytical-standards.com
The warranty for this product is limited to the purchasing price of this product.



16.1.13 Coz

File : D:\2013\14213000 30108CY 30103-1.D
 Operator : JV Jan 2013 3:51 using AsMethod PAHZ.M
 Acquired : 16 Jan 2013 3:51 using Instrument #1
 Sample Name : BRCH (Galactide)
 Misc Info :
 Vial Number : 36



Dr. Ehrenstorfer

Reference Materials for
Residue Analysis

1. Application:

This standard solution is designed for calibration or recalibration of chromatographic systems for the determination of the specified chemical compounds concerning identity and quantification. The product can also be used as reference material for interlaboratory studies to validate analytical procedures.

2. Raw material:

All raw materials used to prepare this standard solution are of the highest purity. After our production process each material is checked for purity by means of applying various analytical methods: elemental analysis, chromatographical properties (GC/FID, GC/ECD, HPLC/DAD, TLC) and physical properties (phase, colour, colour, melting point) and further for detection of traces of water.

3. Manufacturing:

Prior to the production for each standard solution we calculate the necessary weight of the neat material, compensate the difference of the purity of the compound to 100%. We use an electronic scale capable of weighing to 0.000001 g with a built in automatic calibration function, which is executed minimum once a week. Once a month the balance is calibrated with weights complying with the OIML R110 design requirements and traceable to the national prototype of the kilogram. The standard solution is prepared in a clean room. In accordance with the German office of weights and measures every year the balance is calibrated by the German office of weights and measures. The single components are weighed and filled into volumetric flasks (Class A glassware) with the exact quantity of solvent as indicated on the certificate. Solvents are stored and handled in special rooms, which have the constant ambient temperature required from the manufacturer of the volumetric equipment. The tolerance of the weighing procedure and the dilution error adds to a maximum of +/- 1.0 %.

4. Packaging and Storage:

The final formulation was packaged in amber OPC ampoules to prevent photodegradation and then sealed by hand. Every reference material is stored under controlled conditions. One sample of each lot is kept according to GMP rules to bring our staff in a position to check the specific lot every year after the last item was sold.

5. Stability:

In regular intervals each lot is checked for stability. We guarantee the stability of the solution until expiry date given in the Gravimetric Certificate. In case that the tests show a degradation within the period the customer will be notified by Dr. Ehrenstorfer. We recommend to store the ampoules in the dark at 20°C +/- 4°C

6. Gravimetric Certificate:

The documentation gives all the data of the production process with all the information necessary for traceability of each lot. Following GMP rules you are obliged to note the used product, lot number, exact quantity of the product, purity, exact weight, quantity of the solvent, name of the solvent, lot number of the solvent, exact quantity of the solvent, date of production, date of expiry and signature of the person in charge. Copies have to be authorized by stamp, signature of the person in charge according to your quality management handbook and date of authorization.

7. Analytical Quality Control:

The summary of the quality control procedure is documented in the separate Certificate of Analysis. Our company holds the Quality System Certificate DQS-Reg.No.3824-01 for the standard from the ISO 9001/EN 29000 series and the scope as specified. The audit performed by the DQS has verified, that our quality system fulfills the requirements of DIN ISO 9001. The laboratory is accredited by DQS as indicated by the Accreditation Certificate DQS-PL-4536-00 based on DIN EN ISO/IEC 17025:2005 for the weighing of amounts of substances for the preparation of standard solutions.



The Laboratory Dr. Ehrenstorfer is accredited by DQS as indicated by the Accreditation Certificate DQS-PL-4536-00 for the weighing of amounts of substances for the preparation of standard solutions.
 Labor Dr. Ehrenstorfer-Schäfers · Bism.-Schlosses-Str. 6 A · 86199 Augsburg · Germany
 Phone +49 821 9060860 · Fax +49 821 9060888 · info@analytical-standards.com
 The warranty for this product is limited to the purchasing price of this product.
 DQS-PL-4536-00

Gravimetric Certificate

Dr. Ehrenstorfer



Product Identification

15359000 Musk-ketone
Formula C₁₄H₁₈N₂O₅
Mol.Weight 294.31
CAS No. 81-14-1

Reference Materials for Residue Analysis

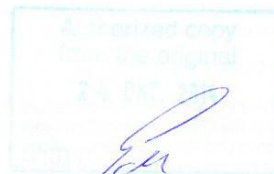
Expiry Date 22.10.2017
Lot Number 41017CY
Store at 20°C in the dark

Please note: The expiry date is valid under recommended storage conditions only.

Gravimetric Data			
Product Name	Conc. (mg/l)	Purity %	Weight (mg)
Musk-ketone	10.000	98.0	1.023
Solvent Information			
Solvent	Lot No.	Exact Quantity (ml)	
Cyclohexane	40707	100.00	
Traceability Data			
15359000 41015	neat product		
15359000 41017CY	10.000 mg/l		
Analytical Data			
Detection: GC/FID	Method Details:		
Column: DB-5, 30 m, ID 0.25 mm	Injector: 320° C		
Inj.-Vol.: 1.00 µl	Start Temperature: 120° C for 4 min		
Flow: 1.0 ml/min	End Temperature: 320° C for 3 min		
Ret.-Time: 13.48 min.	Gradient: 15° C/min		
Identity check RT			
Comment	No chromatogram available.		
The uncertainty/tolerance of this standard is +/- 2.0 %, calculated in accordance with the EURACHEM/CITAC Guide - Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement - Second Edition. The uncertainty given is the expanded combined uncertainty and represents an estimated standard deviation equal to the positive square root of the total variance of the uncertainty of components. The expanded uncertainty is U which is Uc(y)*K, where K is the coverage factor at the 95% confidence level (K=2). The expanded uncertainty is based on the combination of uncertainties associated with each individual operation involved in the preparation of this product.			

Certified on 22.10.2014

by M. Beck *M. Beck*



The Laboratory LGC Labor GmbH is accredited by DAkkS as indicated by the Accreditation Number D-RM-14174-01 has shown competence based on ISO Guide 34:2009 with relevant parts of DIN EN ISO/IEC 17025:2005 for production of certified reference materials in form of organic pure substances and in form of single and multi-component solutions organic pure substances.

LGC Labor GmbH · Bgm.-Schlosser-Str. 6 A · 86199 Augsburg · Germany
Phone +49 821 906080 · Fax +49 821 9060888 · info@analytical-standards.com
The warranty for this product is limited to the purchasing price of this product.

1. Application:

This standard solution is designed for calibration or recalibration of chromatographic systems for the determination of the specified chemical compounds concerning identity and quantification. The product can also be used as reference material for interlaboratory studies to validate analytical procedures.

2. Raw material:

All raw materials used to prepare this standard solution are of the highest purity. After our production process each material is checked by several of the following methods, if applicable: UV-, IR-Spectroscopy, Elemental analysis, chromatographical properties (GC/FID, GC/ECD, GC/MSD, HPLC/DAD, HPLC/MSD, TLC) and physical properties (phase, colour, odor, melting point) and Karl-Fischer for detection of traces of water.

3. Manufacturing

Prior to the production for each standard solution we calculate the necessary weight of the neat material, compensate the difference of the purity of the compound to 100%. We use an electronic scale capable of weighing to 0,000001 g with a built in automatic calibration function, which is executed minimum once a week. Once a month the balance is calibrated with weights complying with the OIML-IR-20 design requirements and traceable to the national prototype of the Physikalisch-Technische Bundesanstalt, Braunschweig, the German office of weights and measurements. Every year the balance is calibrated by the manufacturer service technician. This company is also certified by the DQS following ISO9001. All steps are documented conform to ISO 9001 requirements. The single components are weighed and filled into volumetric flask (class A glassware) with the exact quantity of solvent as indicated on the certificate. Solvents are stored and handled in special rooms, which have the constant ambient temperature required from the manufacturer of the volumetric equipment. The tolerance of the weighing procedure and the dilution error adds to a maximum of +/- 1.0 %.

4. Packaging and Storage:

The final formulation was packaged in amber glass ampoules and then sealed to prevent photodegradation and evaporation. Every reference material is stored under controlled condition. One sample of each lot is kept according GLP rules to allow a recheck of the specific lot even years after the last item was sold.

5. Stability:

In regular intervals each lot is checked for stability. We guarantee the stability of the solution until the date of expiry given on the Gravimetric Certificate. In case, that the tests show a degradation within the shelf life period, the customer will be notified. We recommend to store the ampoules in the dark at 20°C +/- 4°C

6. Gravimetric Certificate:

The documentation gives all the data of the production process with all the information necessary for traceability of each lot. Following GLP rules you are obliged to note the used product, lot number of the product, purity, exact weight/quantity of the product, name of the solvent, lot number of the solvent, exact quantity of the solvent, date of production, date of expiry and signature of the person in charge. Copies have to be authorized by stamp, signature of the person in charge according to your quality management handbook and date of authorization.

7. Analytical Quality Control

The summary of the quality control procedure is documented in the separate Certificate of Analysis. Our company holds the Quality System Certificate DQS-Reg.No.:2874-01 for the standard from the ISO 9001 / EN 29000 series and the scope as specified. The audit performed by the DQS has verified, that our quality system fulfills the requirements of DIN ISO 9001. The company is accredited by DAkkS as indicated by the Accreditation Number D-RM-14174-01 and D-PL-4536.00 ahs shown competence based on ISO Guide 34_2009 with relevant parts of DIN EN ISO/IEC 17025:2005 for production of certified reference materials in form of organic pure substances and in form of single and multi-component solutions organic pure substances.

Gravimetric Certificate

Dr. Ehrenstorfer



Product Identification

15360000 Musk xylene
Formula C₁₂H₁₅N₃O₆
Mol.Weight 297.27
CAS No. 81-15-2

Reference Materials for Residue Analysis

Expiry Date 27.11.2016
Lot Number 31127CY
Store at 20°C in the dark

Please note: The expiry date is valid under recommended storage conditions only.

Gravimetric Data			
Product Name		Conc. ()	Purity %
Musk xylene		10.000	99.0
Weight (mg)			1.015
Solvent Information			
Solvent	Lot No.	Exact Quantity ()	
Cyclohexane	30706	100.00	
Traceability Data			
15360000 31113	neat product		
15360000 31127CY	10.000		
Analytical Data			
Detection: GC/FID	Method Details:		
Column: DB-5, 30 m, ID 0.25 mm	Injector: 280° C		
Inj.-Vol.: 1.00 µl	Start Temperature: 60° C for 5 min		
Flow: 1.0 ml/min	End Temperature: 280° C for 1 min		
Ret.-Time: 19.31 min.	Gradient: 15° C/min		
Identity check RT			
Comment			
The uncertainty/tolerance of this standard is +/- 5.0 %, calculated in accordance with the EURACHEM/CITAC Guide - Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement - Second Edition. The uncertainty given is the expanded combined uncertainty and represents an estimated standard deviation equal to the positive square root of the total variance of the uncertainty of components. The expanded uncertainty is U which is Uc(y)*K, where K is the coverage factor at the 95% confidence level (K=2). The expanded uncertainty is based on the combination of uncertainties associated with each individual operation involved in the preparation of this product.			

Certified on 13.01.2014

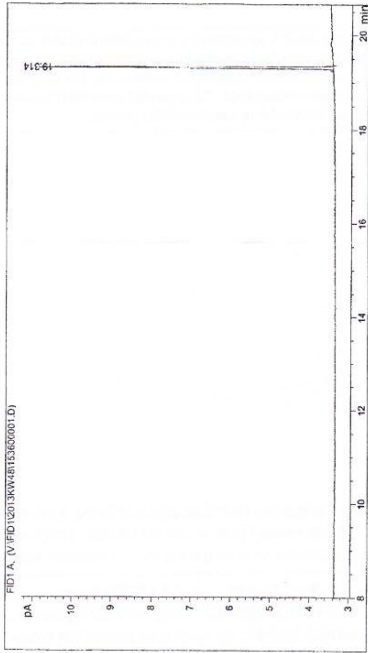
by A. Storr

The Laboratory Labor Dr. Ehrenstorfer-Schäfers is accredited by DAkkS as indicated by the Accreditation Number D-RM-14174-01 has shown competence based on ISO Guide 34:2009 with relevant parts of DIN EN ISO/IEC 17025:2005 for production of certified reference materials in form of organic pure substances and in form of single and multi-component solutions organic pure substances.

Labor Dr. Ehrenstorfer-Schäfers · Bgm.-Schlosser-Str. 6 A · 86199 Augsburg · Germany
Phone +49 821 906080 · Fax +49 821 9060888 · info@analytical-standards.com
The warranty for this product is limited to the purchasing price of this product.

Data File V:\FID\2013RM48\15360001.D
 Sample Name: 31127CY 31113

=====
 Operator : GC/FID1
 Acq. Inlet : 30.11.2013 04:53:01
 Location : Vial 94
 Inj Volume : 1.000 µl
 Seq. Line : 16
 Acq. Method : C:\CHEM32\METHODS\PRESK.M
 Last changed : 04.07.2013 15:13:30
 Analysis Method : V:\FID1\METHODS\PRESK.M
 Last changed : 13.01.2014 16:06:52
 Method Info : (modified after loading)
 Method : peak
 Sample Info : Musk xylene - no shipment by air
 =====



=====
 Area Percent Report
 =====

Sorted By	Retention Time	Area	Height			
Multiplier:	1.0000					
Dilution:	1.0000					
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs						
Signal 1: FID1 A,						
Peak #	RetTime [min]	Sig	Type	Area [pA*s]	Area [pA]	Height [µ]
1	19.314	1	BB	12.12654	7.43333	100.0000
Totals :				12.12654	7.43333	

=====
 *** End of Report ***
 =====

Dr. Ehrenstorfer
 Reference Materials for
 Residue Analysis

- Application:**
 This standard solution is designed for calibration or recalculation of chromatographic systems for the determination of the specified chemical compounds concerning identity and quantification. The product can also be used as reference material for interlaboratory studies to validate analytical procedures.
- Raw material:**
 All raw materials used to prepare this standard solution are of the highest purity. After our production process each material is checked by several of the following methods, if applicable: UV-, IR-Spectroscopy, Elemental analysis, chromatographical properties (GC/FID, GC/ECD, GC/MSD, HPLC/MSD, HPLC/MSD, TLC) and physical properties (phase, colour, odour, melting point) and Karl-Fischer for detection of traces of water.
- Manufacturing:**
 Prior to the production for each standard solution we calculate the necessary weight of the real material, compensate the difference of the purity of the compound to 100%. We use an electronic scale capable of weighing to 0.00001 g with a built in automatic calibration function, which is executed minimum once a week. Once a month the balance is calibrated with weights complying with the OIML-R-20 design requirements and traceable to the national prototype of the Physikalisch-Technische Bundesanstalt, Braunschweig, the German office of weights and measurements. Every year the balance is calibrated by the manufacturer's service technician. This company is also certified by the DGS following ISO 9001. All steps are documented conform to ISO 9001 requirements. The single components are weighed and filled into volumetric flask (glassware) with the exact quantity of solvent as indicated on the certificate. Solvents are stored and handled in accordance with the safety instructions and the instructions of the manufacturer of the volumetric equipment. The tolerance of the weighing procedure and the dilution error adds to a maximum of +/- 1.0 %.
- Packaging and Storage:**
 The final formulation was packaged in amber glass ampoules and then sealed to prevent photodegradation and evaporation. Every reference material is stored under controlled conditions. One sample of each lot is kept according to GLP rules to allow a recheck of the specific lot even years after the last item was sold.
- Stability:**
 In regular intervals each lot is checked for stability. We guarantee the stability of the solution until the date of expiry given on the Grammetric Certificate. In case, that the tests show a degradation within the shelf life period, the customer will be notified by Dr. Ehrenstorfer. We recommend to store the ampoules in the dark at 20° C +/- 4° C.
- Grammetric Certificate:**
 The documentation gives all the data of the production process with all the information necessary for traceability of each lot. Following GLP rules you are obliged to note the used product, lot number of the product, purity, exact weight/quantity of the product, name of the solvent, lot number of the solvent, exact quantity of the solvent, date of production, date of expiry and signature of the person in charge. Copies have to be authorized by stamp, signature of the person in charge according to your quality management handbook and date of authorization.
- Analytical Quality Control:**
 The summary of the quality control procedure is documented in the separate Certificate of Analysis. Our company holds the Quality System Certificate DGS-Reg No.:2874-01 for the standard from the ISO 9001 / EN 29000 series and the scope as specified. The audit performed by the DGS has verified, that our quality system fulfills the requirements of DIN ISO 9001.

The Laboratory Labor Dr. Ehrenstorfer-Schäfers is accredited by DAkkS as indicated by the Accreditation Number D-RM-14174-01 has shown competence based on ISO Guide 34:2009 with relevant parts of DIN EN ISO/IEC 17025:2005 for production of certified reference materials in form of organic pure substances and in form of single and multi-component solutions organic pure substances.

Labor Dr. Ehrenstorfer-Schäfers · Bism-Schleiser-Str. 6 A · 86169 Augsburg · Germany
 Phone +49 821 9069890 · Fax +49 821 9069898 · info@analytical-standards.com
 The warranty for this product is limited to the purchasing price of this product.



Detector de espectrometría de masas triplecuadrupolo

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA
FACULTAD DE QUÍMICA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA**