



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTAD DE QUÍMICA

Departamento de Química Analítica, Nutrición y
Bromatología

OPTIMIZACIÓN DE METODOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS DE ABASTECIMIENTO Y RESIDUALES



José Elías Becerril Bravo
Santiago de Compostela, 2012

TESIS DOCTORAL

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTAD DE QUÍMICA

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología



**OPTIMIZACIÓN DE METODOLOGÍAS
ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE
CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS
DE ABASTECIMIENTO Y RESIDUALES**

José Elías Becerril Bravo

Memoria para optar al grado de Doctor en Química

Santiago de Compostela, marzo de 2012

María Llompart Vizoso y Carmen García Jares, Profesoras Titulares de Universidad y Lucía Sánchez Prado, Investigadora Postdoctoral del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela,

Autorizan:

Al Licenciado José Elías Becerril Bravo a la presentación del trabajo titulado “OPTIMIZACIÓN DE METODOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUAS DE ABASTECIMIENTO Y RESIDUALES” que ha realizado bajo su dirección, para optar por el grado de Doctor en Química.

Y para que así conste, firman la presente autorización en Santiago de Compostela, a día 12 de marzo de 2012.

María Llompart Vizoso Carmen García Jares Lucía Sánchez Prado

Agradecimientos

Expreso mi agradecimiento a la Universidad de Santiago de Compostela. Especialmente agradezco, a mis directoras de Tesis, la Dra. Carmen García Lares, la Dra. María Lempart Vizoso y la Dra. Lucía Sánchez Prado por su orientación, paciencia, colaboración, y por brindarme la oportunidad de culminar mi mayor anhelo académico.

Agradezco el apoyo de mi tutora, la Dra. Blanca Jiménez Cisneros. Así como al Instituto de Ingeniería de la UNAM.

Agradezco a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México, por la beca para realizar el doctorado.

Al Dr. Pablo Lamas Castro agradezco su incondicional disposición, colaboración y enseñanzas. Expreso mi admiración y reconocimiento al Laboratorio de Investigación e Desenvolvimento de Soluções Analíticas (LIDSA), por su vasta productividad científica y eficacia de gestión. Destaco la contribución de la Dra. Marta Lores que con su simpatía acrecienta la labor del laboratorio. Al Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología por su hospitalidad, gracias.

A todos los amigos que desde el inicio me acogieron y apoyaron, muchas gracias (Jorge, Nelia, María F., Néstor, Iria, Paula, Rebe, Pili, ...). A los compañeros, colegas y amigos que en la distancia me apoyaron (Judith, Cati, Víctor, Eleina, Alma, Soledad, Inés, Richard, Pepe, José Antonio, Alejandro, ...), gracias.

Mi más sincero agradecimiento a todos los amigos y amigas que siempre me motivaron y colaboraron para lograr mi objetivo. Y también, a los que ya no están.

Gracias, Compostela por tus piedras mojadas y tu siempre verde para contemplar.

Agradezco a mis padres, su inmenso apoyo desde el inicio de esta interminable odisea de aprender.

A Dios, gracias por todo lo que me da.

A Sandy, mi esposa,

Por su amor

Por su cariño

Por su existencia

Por su incondicionalidad

Por estar siempre conmigo

Por ser y estar ahora y aquí

Por contar siempre con su apoyo, ánimo y coraje

A mis hijos Tefina y David,

Por ser parte indivisible de mí

Por ser un ejemplo para ustedes

Por ser mi fuente de inspiración y superación

Por todo lo que me dan

Para ustedes que son todo lo que tengo en la vida

Para la mejor familia que puede anhelar

Para legarles un ejemplo de tenacidad

Para alcanzar un sueño compartido

Para que siempre me recuerden

Para ofrecerles mi admiración

Para brindarles un homenaje

Para mantener su confianza

Para demostrarles mi amor

Para crecer juntos

"Il faut faire de la vie un rêve et faire d'un rêve une réalité"

(Hay que hacer de la vida un sueño y de un sueño una realidad)

Pierre Curie

Índice

Índice

Resumen.....	I
Resumo.....	III
Abstract.....	V
I Justificación y Objetivos.....	3
Bibliografía.....	6
II Introducción.....	9
1 Contextualización.....	9
Bibliografía.....	13
2 Contaminantes orgánicos emergentes.....	14
Bibliografía.....	18
3 Fragancias Alérgenas.....	20
3.1 Clasificación de las fragancias alérgenas.....	24
3.2 Aplicaciones.....	27
3.3 Uso potencial como pesticidas.....	27
3.4 Exposición de las fragancias alérgenas en los seres humanos...	28
3.5 Distribución.....	31
3.6 Evaluación de la alergenicidad de las fragancias.....	33
3.7 Toxicidad.....	43
Bibliografía.....	54
4 Contaminantes con elevado volumen de producción.....	67
Bibliografía.....	76
5 Técnicas analíticas aplicadas a la determinación de contaminantes emergentes en agua.....	80
5.1 Extracción en fase líquida.....	81
5.2 Extracción en fase sólida.....	82
5.3 Microextracción en fase sólida.....	83
5.4 Microextracción emulsificación asistida por ultrasonidos	87
Bibliografía.....	97

III Parte Experimental y Resultados	105
1 Determinación de fármacos ácidos y compuestos potencialmente disruptores endocrinos en agua de abastecimiento y residual por elución selectiva y determinación por GC-MS	105
1.1 Resumen e introducción.....	105
1.2 Parte experimental.....	107
1.2.1 Reactivos y materiales.....	107
1.2.2 Muestreo.....	111
1.2.3 Preparación de las muestras y metodología de validación.....	112
1.2.4 Extracción.....	114
1.2.5 Procedimiento de derivatización.....	115
1.2.6 Análisis mediante cromatografía de gases con espectrometría de masas.....	116
1.3 Resultados y discusión.....	119
1.3.1 Optimización del procedimiento de preparación de muestras.....	119
1.3.2 Estudio de la linealidad y estimación de los límites de detección.....	122
1.3.3 Datos de recuperación.....	125
1.3.4 Concentraciones de analitos en blancos, aguas de manantial y aguas residuales.....	129
Bibliografía.....	135
Anexo. Concentraciones de analitos reportadas por diversos autores en diferentes países.....	140
2 Determinación de fragancias potencialmente alérgicas por microextracción en fase sólida	143
2.1 Introducción y Resumen	143
2.2 Parte experimental.....	145
2.2.1 Reactivos, gases y disolventes.....	145
2.2.2 Patrones.....	147
2.2.3 Muestras.....	147
2.2.4 Procedimiento de SPME.....	147
2.2.5 Limpieza del material y acondicionamiento de fibras de SPME.....	148

2.2.6	Gestión de residuos.....	149
2.2.7	Análisis cromatográfico y detección.....	149
2.3	Optimización del proceso.....	152
2.4	Parámetros analíticos de calidad del método.....	157
2.5	Análisis de muestras reales.....	160
	Bibliografía.....	166
3	Determinación de fragancias alérgenas por microextracción-emulsificación asistida por ultrasonidos.....	168
3.1	Introducción y Resumen.....	168
3.2	Parte experimental	171
3.2.1	Reactivos, gases y disolventes.....	171
3.2.2	Patrones.....	173
3.2.3	Muestras.....	173
3.2.4	Procedimiento de USAEME.....	173
3.2.5	Limpieza del material y gestión de residuos.....	174
3.2.6	Análisis cromatográfico y detección.....	174
3.3	Discusión de Resultados.....	177
3.3.1	Optimización del proceso: Diseño multifactorial.....	178
3.3.2	Parámetros analíticos de calidad del método.....	185
3.3.3	Análisis de muestras reales.....	189
	Bibliografía.....	191
4	Microextracción-emulsificación asistida por ultrasonidos para el análisis de compuestos químicos de alto volumen de producción en muestras de agua.....	194
4.1	Introducción y Resumen	194
4.2	Parte experimental.....	196
4.2.1	Reactivos, gases y disolventes.....	196
4.2.2	Patrones.....	197
4.2.3	Muestras.....	197
4.2.4	Procedimiento de USAEME con derivatización <i>in-situ</i>	198
4.2.5	Cloración.....	199
4.2.6	Limpieza del material y gestión de residuos.....	199
4.2.7	Análisis cromatográfico y detección.....	199
4.3	Optimización del proceso.....	202

Indice

4.4	Parámetros analíticos de calidad del método.....	208
4.5	Análisis de muestras reales.....	209
4.6	Experimentos de cloración.....	210
	Bibliografía.....	217
IV	Conclusiones	223
Anexo I	Abreviaturas - Acrónimos	231
Anexo II	Publicaciones	243

Resumen

Los cuerpos de agua se han utilizado para abastecer a las poblaciones, así como para eliminar sus propios desechos, lo que ha provocado que con el paso del tiempo la cantidad y tipo de residuos que se liberan en los cursos de agua se hayan incrementado y diversificado, con el consecuente deterioro de la calidad original del recurso hídrico. Actualmente, existe un interés creciente por los “*contaminantes emergentes*” entre los que se encuentran fármacos, productos de cuidado personal, surfactantes, aditivos industriales, pesticidas, esteroides y hormonas, así como los subproductos de la desinfección del agua. Se ha demostrado que estos compuestos se adhieren al ciclo hidrológico, debido a su persistencia. Estos contaminantes corresponden, en la mayoría de los casos, a sustancias no reguladas, que pueden ser candidatas a regulación futura dependiendo de las investigaciones sobre sus efectos potenciales en la salud y los datos de monitorización con respecto a su incidencia en el ambiente. Muchos de estos contaminantes no son eliminados por medio de los sistemas convencionales de potabilización y depuración.

En el presente trabajo de Tesis doctoral se han desarrollado metodologías analíticas basadas en la extracción en fase sólida, la microextracción en fase sólida y la microextracción–emulsificación asistida por ultrasonidos para determinar contaminantes orgánicos emergentes en agua. El análisis se ha realizado mediante cromatografía de gases con detectores selectivos de masas.

La validación de los métodos propuestos en términos de precisión y exactitud demuestran su fiabilidad. Además, los límites de detección y cuantificación se situaron en el subnanogramo por mililitro en la mayoría

de los casos. Los procedimientos se aplicaron a muestras acuosas de diversos orígenes.

Durante el desarrollo y aplicación de las metodologías se ha tratado de cumplir con los principios de la “Química Analítica Verde”, y se proponen procedimientos analíticos sostenibles para su aplicación al contexto de países emergentes como México.

Resumo

Os corpos de auga utilizáronse para abastecer ás poboacións para consumo humano, así como para eliminar os seus propios refugallo, o que provocou que, co paso do tempo, a cantidade e tipo de residuos que se liberan nos cursos de auga se incrementaran e diversificaran, coa consecuente deterioración da calidade orixinal do recurso hídrico. Actualmente, existe un interese crecente polos contaminantes emerxentes entre os que se atopan fármacos, produtos de coidado persoal, surfactantes, aditivos industriais, pesticidas, esteroides e hormonas, así como os subprodutos da desinfección da auga. Demostrouse que estes compostos adhírense ao ciclo hidrolóxico, debido á súa persistencia. Estes contaminantes corresponden, na maioría dos casos, a sustancias non reguladas, que poden ser candidatas a regulación futura dependendo das investigacións sobre os seus efectos potenciais na saúde e os datos de monitorización con respecto á súa incidencia no ambiente. Moitos destes contaminantes non son eliminados por medio dos sistemas convencionais de potabilización e depuración.

No presente traballo de Tese doutoral desenvolvéronse metodoloxías analíticas baseadas na extracción en fase sólida, a microextracción en fase sólida e a microextracción-emulsificación asistida por ultrasóns para determinar contaminantes orgánicos emerxentes en auga. A análise realizouse mediante cromatografía de gases con detectores selectivos de masas.

A validación dos métodos propostos en termos de precisión e exactitude amosan a súa fiabilidade. Ademais, os límites de detección e cuantificación situáronse no subnanogramo por mililitro na maioría dos

casos. Os procedementos aplicáronse a mostras acuosas de diversas procedencias.

Durante o desenvolvemento e aplicación das metodoloxías tratouse de cumprir cos principios da "Química Analítica Verde", e proponse procedementos analíticos sustentables para a súa aplicación ao contexto de países emerxentes como México.

Abstract

Water sources have been used to supply the populations with water for human consumption, as well as to eliminate their own waste, which over time has caused that the amount and type of wastes released into water courses have increased and diversified, with the consequent deterioration of the original quality of the water resource. Currently, there is a growing interest in "*emerging contaminants*" such as pharmaceuticals and personal care products, surfactants, industrial additives, pesticides, steroids and hormones, as well as disinfection by-products. It has been shown that these compounds incorporate the hydrological cycle, due to their persistence. These contaminants are, in most cases, unregulated pollutants, which may be candidates for future regulation depending on research on their potential effects on health and the monitoring data with respect to their impact on the environment. Many of these contaminants are not removed through conventional systems of wastewater treatment and water potabilisation.

In this doctoral thesis study, analytical methodologies based on solid phase extraction, solid-phase microextraction and ultrasound-assisted emulsification-microextraction to determine emerging organic contaminants in water have been developed. The analysis was carried out using gas chromatography with mass selective detectors.

The validation of the proposed methods in terms of precision and accuracy demonstrates their reliability. In addition, the limits of detection and quantification were in the sub-nanogram per millilitre in the majority of cases. The procedures were applied to aqueous samples of different source.

During the development and implementation of the methodologies, principles of the "green analytical chemistry" were intended to be enforced and sustainable analytical procedures for their implementation to the context of emerging countries as Mexico are proposed.

I. Justificación y Objetivos

I. Justificación y Objetivos

En las últimas dos décadas se han desarrollado, numerosas investigaciones para la identificación, origen, destino y efectos de contaminantes orgánicos detectados en aguas. Entre estos contaminantes encontramos algunos de origen industrial pero también de uso doméstico, tales como, insecticidas, alquilfenoles y sus etoxilados, bisfenol A, entre otros. Los fármacos usados en seres humanos y en animales han sido también identificados como contaminantes ambientales emergentes (Daughton, 2004).

Entre los fármacos con y sin prescripción médica se han detectado analgésicos, antiinflamatorios, antiepilépticos, β -bloqueadores y antibióticos, entre otros, que son descargados a los sistemas de drenaje. La presencia de estos contaminantes emergentes en efluentes municipales representa un impacto negativo tanto para la salud como para los ecosistemas (Ternes et al., 2004).

Por otro lado, las fragancias están omnipresentes en la sociedad moderna. En las últimas décadas, el número de productos perfumados ha crecido considerablemente. Muchos productos de consumo sin olor ahora se pueden adquirir con varios aromas, por ejemplo, papel higiénico, pañuelos desechables, productos de papelería, velas, arena para gatos, telas y cigarrillos. También, cada vez más, los espacios interiores se aromatizan con perfumes, como las estaciones del metro, centros comerciales, oficinas, restaurantes o cines, y nuestros propios hogares. En general, la preocupación por las fragancias se percibe desde tres ámbitos diferentes:

- 1) Los efectos perjudiciales de las sustancias químicas que componen las fragancias en la piel, como son dermatitis irritante, dermatitis alérgica de contacto, fototoxicidad y fotoalergia.
- 2) Los efectos tóxicos que pueden surgir a través de la absorción transdérmica e inhalación de estas sustancias.
- 3) Las consecuencias de la liberación de las fragancias al medioambiente a través de las aguas residuales que son tratadas en las estaciones depuradoras.

Por otra parte, la preocupación creciente por los residuos de compuestos de importancia industrial (compuestos de alto volumen de producción) exige la evaluación de su incidencia y destino en el medio ambiente. La producción mundial anual de muchos de estos productos químicos se estima en varios cientos o miles de toneladas. Los compuestos químicos de alto volumen de producción abarcan una amplia gama de sustancias químicas que pueden entrar fácilmente al medio acuático y se consideran contaminantes emergentes en aguas. En este trabajo se han seleccionado cuatro compuestos químicos procedentes de familias muy diferentes: benzotiazol, 4-*tert*-butilfenol, 2-fenilfenol, y butóxido de piperonilo.

En resumen, el objetivo principal de las investigaciones presentadas en esta Tesis Doctoral es el desarrollo de metodologías analíticas para determinar contaminantes orgánicos emergentes en muestras acuosas.

El trabajo se centra en el desarrollo de nuevas metodologías de análisis de algunos grupos de contaminantes emergentes en agua. El primer método desarrollado se aplicó para la extracción y determinación de fármacos ácidos y compuestos disruptores endócrinos potenciales en aguas, mediante extracción en fase sólida (SPE) con elución selectiva,

derivatización y análisis mediante cromatografía de gases–espectrometría de masas (GC-MS).

Para la determinación de las fragancias alérgenas se aplicaron dos metodologías, la microextracción en fase sólida (SPME) y la microextracción-emulsificación asistida por ultrasonidos (USAEME); esta última, se empleó también para la determinación de contaminantes emergentes de elevado volumen de producción.

Todos los compuestos considerados pueden suponer un riesgo potencial para los ecosistemas acuáticos y, por tanto, para el ser humano. Adicionalmente, y debido a que la cloración es el método más común de desinfección del agua, se aborda por primera vez, el estudio del comportamiento de los compuestos de alto volumen de producción seleccionados en relación con la cloración.

Los métodos analíticos que se desarrollan en esta Tesis tienen como finalidad minimizar el consumo de disolventes orgánicos durante el proceso analítico. El análisis se basa en la cromatografía de gases con detectores selectivos de masas.

El segundo objetivo de esta Tesis Doctoral es aportar información oportuna en relación con la presencia de contaminantes orgánicos emergentes en muestras de diferentes recursos hídricos (aguas superficiales, subterráneas y residuales).

Por tanto, se trata de aportar metodologías analíticas eficaces, de bajo coste, respetuosas con el ambiente y ampliamente aplicables al contexto de un país emergente como México.

Bibliografía

Daughton C. G. (2004), Non-regulated water contaminants: emerging research, *Environ Impact Asses*, 24, 711-732.

Ternes T.A., Joss A., Siegrist H. (2004) Scrutinizing pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment, *Environ Sci Technol*, 38, 392A–399A.

II. Introducción

II. Introducción

1. Contextualización

Los seres humanos necesitan prioritariamente disponer de agua con la calidad apta para garantizar su salud y además considerar la sostenibilidad del recurso para asegurar también esa calidad para las generaciones futuras.

En México, la aplicación de esta premisa es complicada debido, entre otras razones, a la existencia de una incipiente tecnología, así como a recursos económicos insuficientes para aplicarlos en este sector.

En este contexto, según la Comisión Nacional del Agua (CONAGUA), órgano oficial del sector hídrico en México, en 2008 se tuvieron 1186 sitios de monitoreo de la calidad del agua operados por CONAGUA, considerándose principalmente tres indicadores: Demanda Bioquímica de Oxígeno a 5 días (DBO_5), Demanda Química de Oxígeno (DQO) y Sólidos Suspendidos Totales (SST). Los resultados en 2008 mostraban que tenían una calificación de “excelente” el 40.6% de los sitios para DBO_5 , el 23.3% para DQO y el 42.3% para SST. Para el resto de los sitios su calificación variaba de “buena calidad” a “fuertemente contaminada” (CONAGUA, 2010). Esta situación refleja la deficiencia de información, ya que no se especifican los contaminantes y las concentraciones en los sitios de monitoreo. Por otra parte, la CONAGUA reporta que existen 1833 plantas de tratamiento de aguas residuales municipales en operación en 2008 que trataron el 40% de los 208 m³/s de aguas residuales recolectados. Además, se estima que la industria trató 33.7 m³/s en las 2082 plantas en operación a nivel nacional durante el mismo año (CONAGUA, 2010).

En relación con la calidad del agua cabe destacar que en el periodo 2000-2009, el agua suministrada y desinfectada para consumo humano pasó del 94.4% al 97.1% y la cobertura de tratamiento de aguas residuales pasó del 23% al 42.1%. Estos datos reflejan el enorme retraso para garantizar un agua con la calidad apta para consumo humano. Esto se debe a que se considera agua para consumo humano el agua que previamente se ha desinfectado sin indicar si cumple con la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994 que señala los límites permisibles de calidad y tratamiento a que debe someterse el agua para su potabilización, y que incluye una serie de parámetros físicos y químicos además de los microbiológicos, que son el objetivo de la desinfección.

En las últimas décadas la población en México ha experimentado un crecimiento considerable, de 19.7 millones de habitantes que existían en 1940 se incrementó a 112 millones en 2010 (INEGI, 2010). Por esta razón se ha incrementado de manera importante el consumo de agua y, consecuentemente, la generación de una mayor cantidad de aguas residuales. En México, un volumen considerable de aguas residuales se vierte sin tratamiento previo, contaminando el suelo y las aguas superficiales, tanto en zonas urbanas como rurales, creando un riesgo evidente para la salud humana y el medio ambiente.

La preocupación por las descargas de las aguas residuales y sus efectos al medio ambiente ha dado lugar a la promulgación de leyes como la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente (1988). Uno de los objetivos de esta ley es prevenir y controlar la contaminación del agua y proteger los recursos hídricos, así como el establecimiento de normas para establecer límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales:

- Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales, publicada el 6 de enero de 1997.
- Norma Oficial Mexicana NOM-002-SEMARNAT-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal, publicada el 3 de junio de 1998.
- Norma Oficial Mexicana NOM-003-SEMARNAT-1997, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reusen en servicios al público, publicada el 21 de septiembre de 1998.
- Norma Oficial Mexicana NOM-004-SEMARNAT-2001, que establece las especificaciones y límites máximos permisibles de contaminantes en lodos y biosólidos para su aprovechamiento y disposición final, publicada el 15 de agosto de 2003.

Este contexto permite reflexionar sobre la inminente necesidad de ampliar la perspectiva referente a la “calidad del agua”. Tradicionalmente éste concepto ha sido antropocéntrico, referido al agua para consumo humano. Sin embargo, a finales del siglo XIX, después de que se demostrase que algunas enfermedades gastrointestinales eran consecuencia de residuos fecales (Montiel, 2004), la calidad del agua se refirió principalmente a la ausencia de microorganismos patógenos de origen hídrico. Es importante señalar que es el concepto que aún prevalece para la gestión del agua en México. Posteriormente, se reconoció que otras sustancias presentes en el agua como metales pesados y plaguicidas, son nocivas para la

salud humana. Además, la descarga de aguas residuales a cuerpos de agua superficial provoca eutrofización y anoxia debido a altas concentraciones de nutrientes (Koelmans et al., 2001) que afectan el uso del agua y, por tanto, a las actividades económicas. En la década de los sesenta se reconoció el riesgo de la presencia de compuestos orgánicos tóxicos en el agua y se definió una lista de contaminantes prioritarios, pero debido a la falta de información toxicológica, esta lista se realizó con base en volúmenes de producción, y las concentraciones permisibles en el agua se definieron en base a los límites de detección de las técnicas analíticas disponibles (Erickson, 2002).

Bibliografía

CONAGUA (2010) Comisión Nacional del Agua, Situación del Subsector Agua Potable, Alcantarillado y Saneamiento, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México.

Erickson, B.E. (2002) Analyzing the ignored environmental contaminants, *Environ Sci Technol*, 36(7), 140A-145A.

INEGI (2010) Censo de Población y Vivienda, Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática, <http://www.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/default.aspx?src=487> (Consultado el 22 de agosto de 2011).

Koelmans A. A., Van der Heijde A., Knijff L.M., Aalderink R.H. (2001) Integrated Modelling of Eutrophication and Organic Contaminant Fate & Effects in Aquatic Ecosystems. A Review, *Wat Res*, 35 (15), 3517-3536.

Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente (1988), reformada en 1996 y 2011, Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión, Dirección General de Servicios de Documentación, Información y Análisis, Estados Unidos Mexicanos.

Montiel A. (2004) Controle et preservation de la qualite microbiologique traitements de desinfection, *Revue Française des Laboratoires*, 2004 (364), 51-53.

Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994 Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamiento a que debe someterse el agua para su potabilización. Publicada el 18 de enero de 1996 y modificada el 22 de noviembre de 2000.

2. Contaminantes orgánicos emergentes

El avance científico y tecnológico ha propiciado el surgimiento de un universo de compuestos químicos potencialmente tóxicos que repercuten en la salud y el deterioro ambiental. Estos productos químicos suponen escenarios previamente desconocidos e inesperados de exposición a los mismos por periodos prolongados. Esto conduce a una controversia en torno a los agentes contaminantes "emergentes" que se presenta, entre otros factores, debido a la inexactitud en la definición y la dimensión del universo químico alrededor del cual se enfoca este tema.

En la Tabla II.1 se presenta algunos ejemplos de los principales grupos de contaminantes orgánicos emergentes.

En este sentido se deben mencionar las características químicas (grupo funcional y estructura química), usos (nuevos usos en los sectores industriales o de consumo), efectos (descubrimiento de consecuencias o nuevas interacciones), mecanismos de reacción, fuente u origen (nuevos tipos de fuentes u orígenes previamente desconocidos para los productos químicos existentes), y la ruta de exposición (vías no consideradas anteriormente). Todas estas consideraciones son susceptibles de interrelacionarse en varios niveles (Daughton, 2004).

La química analítica juega un papel fundamental en la detección de los contaminantes debido al aumento de las clases de compuestos químicos que pueden ser detectados, y a que los límites de detección de éstos son cada vez más bajos. Gracias a estos avances es posible ampliar y refinar la perspectiva en relación con la "pureza del agua".

Tabla II.1. Principales clases de contaminantes orgánicos emergentes

Clases de compuestos	Ejemplos
Fármacos	Paracetamol, carbamazepina, diazepam, iopamidol
Esteroides y hormonas	Estradiol, estrona, estriol, dietilstilbestrol
Drogas de abuso	Anfetamina, cocaína, tetrahidrocanabinol
Fragancias	Musks policíclicas, nitromusks
Filtros solares	3-Benzofenona, ácido octildimetil-p-aminobenzoico (ODPABA)
Antioxidantes y conservantes	Fenoles y parabenos
Insecticidas y repelentes	Piretroides, N,N-dietiltoluamida (DEET)
Biocidas	Triclosan, clorofeno
Detergentes tensioactivos	Alquilfenoles y derivados
Retardantes de llama	Éteres difenilo polibromados (PBDEs), ésteres organofosforados
Plastificantes	Ftalatos, bisfenol A, ácido perfluorooctanoico (PFOA), perfluorooctanosulfonato (PFOS)
Aditivos y agentes industriales	Agentes quelantes, sulfonatos aromáticos, benzotriazoles, 1,4-dioxano
Aditivos de la gasolina	Éteres de dialquilo, metil t-butil éter (MTBE)
Subproductos de desinfección	Bromaldehídos, cianoformaldehído, bromato

Actualmente, se sabe que existe una amplia variedad de compuestos químicos en el agua, además de los contaminantes prioritarios. Estos contaminantes orgánicos emergentes están presentes en concentraciones del orden de los nanogramos por litro; y, los efectos que pueden provocar en la biota son, en algunos casos, desconocidos por los efectos sinérgicos o porque sus metabolitos pueden ser más nocivos que sus precursores (la Farré et al., 2008; Murray et al., 2010; Pal et al., 2010; von der Ohe et al., 2011).

Los contaminantes antropogénicos se han dispersado ampliamente en el ambiente y están aflorando, o manifestandose en las aguas superficiales y subterráneas como resultado de, entre otros, emisiones

industriales (Botalova et al., 2011), la ineficiente disposición de residuos sólidos (Slack et al., 2007) (por ejemplo la incineración y los basureros), los derrames accidentales, y la aplicación incontrolada (pesticidas en la agricultura, recarga artificial de agua subterránea, disposición en el suelo de los lodos de las estaciones depuradoras de aguas residuales) (Kasprzyk-Hordern et al., 2009).

Por otra parte, la información sobre los efectos potenciales en la salud humana asociados con la exposición crónica a concentraciones traza de compuestos orgánicos, como los contaminantes emergentes, a través de rutas como el agua, es escasa (Stackelberg et al., 2004).

Un grupo particular de contaminantes orgánicos emergentes son los productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCPs, por sus siglas en inglés). Los productos de cuidado personal (PCPs) son compuestos diversos que se usan en jabones, lociones, pastas dentífricas, fragancias, repelentes de insectos, bloqueadores solares, entre otros. Son productos de uso externo y no están sujetos a alteraciones metabólicas: los PCPs se incorporan directamente al medio ambiente debido al uso frecuente (Ternes et al., 2004). Muchos de estos compuestos se usan en grandes cantidades y estudios recientes indican que muchos son ambientalmente persistentes, bioactivos y tienen un alto potencial de bioacumulación (Brausch y Rand, 2011; Peck, 2006).

Los "contaminantes orgánicos emergentes" corresponden, entonces en la mayoría de los casos, a contaminantes no regulados, que pueden ser candidatos a regulación futura dependiendo de los resultados de investigaciones sobre sus efectos potenciales en la salud y el medio ambiente y los datos de monitorización con respecto a su incidencia. Para la mayoría de estos contaminantes emergentes, la incidencia, la contribución de riesgo y los datos ecotoxicológicos no están disponibles,

así que es difícil predecir qué efectos en la salud pueden tener en los seres humanos y los organismos acuáticos (Barceló, 2003).

En México el estudio sobre contaminantes orgánicos emergentes es incipiente. Por un lado debido a la escasa infraestructura y, por otro, a la falta de especialistas que desarrollen y validen metodología analítica aplicable para su determinación y análisis. La experiencia que se tiene al respecto se limita a la determinación de fármacos, nonilfenol, triclosan y ftalatos en agua (Gibson et al., 2007) y en suelos (Durán-Álvarez et al., 2009); y estudios de aplicación de las metodologías en diversos entornos (Gibson et al., 2010; Chávez et al., 2011).

Bibliografía

Barceló D. (2003), Emerging pollutants in water analysis, *TrAC Trend Anal Chem*, 22, xiv-xvi.

Botalova O., Schwarzbauer J., al Sandouk N. (2011) Identification and chemical characterization of specific organic indicators in the effluents from chemical production sites, *Water Res*, 45 (12), 3653-3664.

Brausch J. M., Rand G. M. (2011) A review of personal care products in the aquatic environment: Environmental concentrations and toxicity, *Chemosphere*, 82 (11), 1518-1532.

Chávez A., Maya C., Gibson R., Jiménez B. (2011) The removal of microorganisms and organic micropollutants from wastewater during infiltration to aquifers after irrigation of farmland in the Tula Valley, Mexico, *Environ Pollut*, 159, 1354-1362.

Daughton C. G. (2004), Non-regulated water contaminants: emerging research, *Environ Impact Asses*, 24, 711-732.

Durán-Álvarez J.C., Becerril-Bravo E., Silva-Castro V., Jiménez B., Gibson R., (2009) The analysis of a group of acidic pharmaceuticals, carbamazepine, and potential endocrine disrupting compounds in wastewater irrigated soils by gas chromatography–mass spectrometry, *Talanta*, 78, 1159–1166.

Gibson R., Becerril-Bravo E., Silva-Castro V., Jiménez B., (2007) Determination of acidic pharmaceuticals and potential endocrine disrupting compounds in wastewaters and spring waters by selective elution and analysis by gas chromatography–mass spectrometry, *J Chromatog A*, 1169, 31-39.

Gibson R., Durán-Álvarez J. C., León Estrada K., Chávez A., Jiménez B. (2010) Accumulation and leaching potential of some pharmaceuticals and potential endocrine disruptors in soils irrigated with wastewater in the Tula Valley, Mexico, *Chemosphere*, 81 (11), 1437-1445.

Kasprzyk-Hordern B., Dinsdale R. M., Guwy A. J., (2009) The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters, *Water Res*, 43 (2), 363–380.

la Farré M., Pérez S., Kantiani L., Barceló D. (2008) Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment, *TrAC Trend Anal Chem*, 27 (11), 991-1007.

Murray K. E., Thomas S. M., Bodour A. A. (2010) Prioritizing research for trace pollutants and emerging contaminants in the freshwater environment, *Environ Pollut*, 158 (12), 3462-3471.

Pal A., Gin K. Y., Lin A. Y., Reinhard M. (2010) Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: Review of recent occurrences, sources, fate and effects, *Sci Total Environ*, 408 (24), 6062-6069.

Peck A. M. (2006) Analytical methods for the determination of persistent ingredients of personal care products in environmental matrices, *Anal Bioanal Chem*, 386, 907-939.

Slack R. J., Gronow J. R., Hall D. H., Voulvoulis N. (2007) Household hazardous waste disposal to landfill: Using LandSim to model leachate migration, *Environ Pollut*, 146 (2) 501-509.

Stackelberg, P. E., Furlong E. T., Meyer, M. T., Zaugg, S. D., Henderson A. K., Reissman D. B. (2004) Persistence of pharmaceutical compounds and other organic wastewater contaminants in a conventional drinking-water-treatment plant, *Sci Total Environ*, 329 (1-3), 99-113.

Ternes T.A., Joss A., Siegrist H. (2004) Scrutinizing pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment, *Environ Sci Technol*, 38, 392A–399A.

von der Ohe P. C., Dulio V., Slobodnik J., De Deckere E., Kühne R., Ralf-Uwe E., Ginebreda A., De Cooman W., Schüürmann G., Brack W. (2011) A new risk assessment approach for the prioritization of 500 classical and emerging organic microcontaminants as potential river basin specific pollutants under the European Water Framework Directive, *Sci Total Environ*, 409 (11), 2064-2077.

3. Fragancias Alérgicas

En la Unión Europea (EU) un cosmético es toda sustancia o preparado destinados a ser puestos en contacto con las diversas partes superficiales del cuerpo humano (epidermis, sistema piloso y capilar, uñas, labios y órganos genitales externos) o con los dientes y las membranas mucosas de la cavidad oral, con el fin exclusivo o principal de limpiarlos, perfumarlos, modificar su aspecto y/o corregir los olores corporales y/o protegerlos o mantenerlos en buen estado (EU, 2007).

La definición de productos de cuidado personal (PCPs) / cosméticos en los Estados Unidos de Norteamérica se refiere a artículos para ser frotados, esparcidos, rociados o que se aplican al cuerpo humano o parte de él para limpiar, embellecer, fomentar la atracción, o alterar la apariencia, y componentes de productos de uso común con ese fin, excepto la inclusión del jabón (US FDA, 2007).

En México, se consideran productos cosméticos las sustancias o formulaciones destinadas a ser puestas en contacto con las partes superficiales del cuerpo humano: epidermis, sistema piloso y capilar, uñas, labios y órganos genitales externos, o con los dientes y mucosas bucales con el fin exclusivo o principal de limpiarlos, perfumarlos, ayudar a modificar su aspecto, protegerlos, mantenerlos en buen estado o corregir los olores corporales o atenuar o prevenir deficiencias o alteraciones en el funcionamiento de la piel sana (Ley General de Salud, 1984).

De acuerdo con estas definiciones los PCPs y/o cosméticos incluyen una gran variedad de tipos de productos y formulaciones, tales como jabones, champús y productos para la ducha, protectores solares, productos para la piel y cabello, tintes para el cabello, maquillajes,

barras de labios, cremas dentales, productos de cuidado dental, desodorantes, productos de higiene personal y muchos otros.

Por otra parte, las fragancias como ingrediente, de acuerdo con la Asociación Internacional de Perfumería (IFRA) es "cualquier sustancia básica utilizada en la preparación de materiales que por sus propiedades aromáticas mejora su olor " (IFRA 2011). Desde el punto de vista fisiológico, las fragancias son mensajeros químicos que reaccionan con los receptores de las células olfativas y son eficaces en umbrales bajos.

Existen alrededor de 30000 preparaciones de fragancias conocidas. Estas pueden ser aceites esenciales, extractos, compuestos naturales, compuestos sintéticos, y pueden contener isómeros, contaminantes y/o residuos de producción. Los ingredientes de las fragancias pueden ser alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos, aminas, ésteres, lactonas, heterociclos, hidrocarburos, sulfuros o mercaptanos. La mayoría de ellos son moléculas pequeñas con menos de 20 átomos de carbono. Hoy en día, la mayoría de las fragancias se sintetizan por procesos industriales (Klaschka y Kolossa-Gehring, 2007).

La composición de las fragancias puede contener desde unas pocas decenas hasta varios cientos de ingredientes distintos, que comprenden además de las propias fragancias, disolventes, agentes quelantes, conservantes, antioxidantes y otros aditivos. La composición exacta está restringida y protegida por la marca del producto. La composición de preparaciones a partir de recursos naturales tales como aceites esenciales puede ser muy compleja. Las fragancias también pueden ser empleadas para otros fines en el producto, e incluso sus metabolitos juegan un papel importante, por ejemplo, el alcohol bencílico se utiliza como conservante, disolvente o agente reductor de la viscosidad. El alcohol bencílico se metaboliza a ácido benzoico, que a su vez puede

ser una fragancia y un conservante (Klaschka y Kolossa-Gehring, 2007).

El uso de productos perfumados se ha asociado con un incremento en la frecuencia de dermatitis alérgica de contacto. En este sentido se han identificado 26 fragancias sospechosas de causar esa afectación. La Directiva 2003/15/CE de la Unión Europea (EC, 2003) ha declarado la lista de 26 "fragancias alérgicas" que deberán estipularse en la etiqueta del producto terminado si su contenido supera cierto umbral (0.01% para cosméticos de aclarado y 0.001% en cosméticos de permanencia).

Para llevar a cabo una evaluación adecuada de la seguridad de los componentes de las fragancias se debe definir acertadamente sus características químicas básicas. La estructura química ayuda a predecir la absorción transdérmica, el metabolismo y la disposición, y los grupos funcionales que pueden influir en su toxicidad. A pesar de que se abarca más de 2600 productos químicos, las fragancias se pueden clasificar en aproximadamente 23 grupos estructurales básicos (Bickers et al., 2003).

El uso de un enfoque analítico permite algunas generalizaciones. De las fragancias consideradas en la base de datos del Research Institute for Fragrance Materials, 2127 (88%) son estructuralmente simples, de bajo peso molecular, predominantemente sustancias semi-volátiles formadas por carbono, hidrógeno y oxígeno. Por el contrario, sólo el 6.7% del total de los materiales contienen nitrógeno, y sólo cinco contienen halógenos (Bickers et al., 2003).

Las principales propiedades físico-químicas de las fragancias alérgicas consideradas en este estudio se muestran en la Tabla II.2.

Tabla II.2. Propiedades físico-químicas de las fragancias alérgicas.

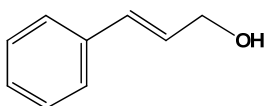
Compuesto	Numero CAS	Peso Molecular	log K_{ow}	Punto de ebullición (°C)	Solubilidad (mg L ⁻¹)
Pineno	80-56-8	136	4.37	155	18
Limoneno	5989-27-5	136	4.57	176	13.8
Alcohol bencílico	100-51-6	108	1.05	205	40 000
Linalol	78-70-6	154	3.28	198	1589
Octanoato de 2-metilo	111-12-6	154	2.60	219	-
Citronelol	106-22-9	156	3.38	225	322
Citral	5392-40-5	152	3.17	229	590
Geraniol	106-24-1	154	3.28	229	531
Cinamaldehído	104-55-2	132	2.22	252	1420
Hidroxicitronelal	107-75-5	172	1.54	240	23 800
Anis alcohol	105-13-5	138	1.10	259	2070
Cinamil alcohol	104-54-1	134	1.93	250	1800
Eugenol	97-53-0	164	2.20	256	<1000
Metileugenol	93-15-2	178	2.9	248	500
Isoeugenol	97-54-1	164	2.45	267	984
Cumarina	91-64-5	146	1.39	298	2500
α -isometil ionona	127-51-5	206	4.41	266	16
Lilial®	80-54-6	204	4.07	279	33
Amil cinamal	122-40-7	202	4.80	289	8.5
Lyrail®	31 906-04-4	210	2.53	319	185-1045
Alcohol cinamflico	101-85-9	204	4.37	>200	26
Farnesol	4602-84-0	222	5.31	283	267
Hexilcinamaldehído	101-86-0	216	4.82	308	2.8
Benzoato de bencilo	120-51-4	212	3.97	324	19.8
Salicilato de bencilo	118-58-1	228	4.31	320	<1000
Cinamato de bencilo	103-41-3	238	3.65	371	9

3.1 Clasificación de las fragancias alérgenas

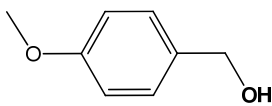
A pesar de la diversidad de las propiedades y características de las fragancias alérgenas, se pueden clasificar en grupos diferentes con propiedades semejantes. Una posible clasificación es considerando un grupo funcional en particular, en este caso se tiene:

Fragancias alérgenas de tipo alcohol:

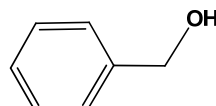
Cinamil alcohol, anís alcohol, alcohol bencílico, alcohol cinámico, citronelol, farnesol, geraniol, linalol



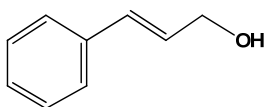
Cinamil alcohol



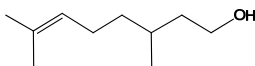
Anís alcohol



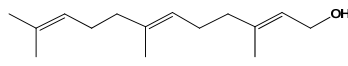
Alcohol bencílico



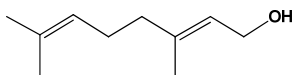
Alcohol cinámico



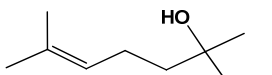
Citronelol



Farnesol



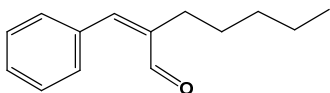
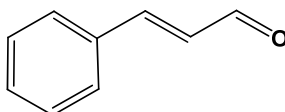
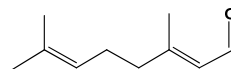
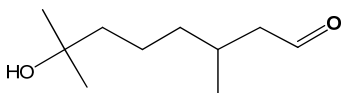
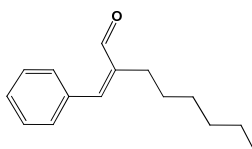
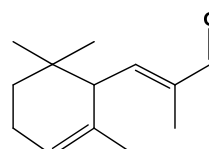
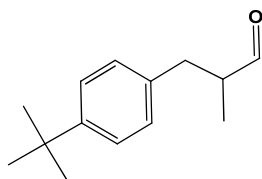
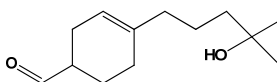
Geraniol



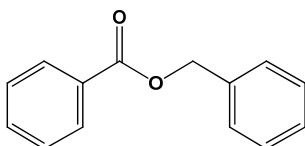
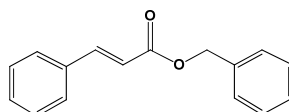
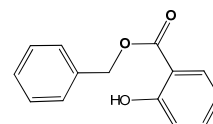
Linalol

Compuestos con grupo carbonilo:

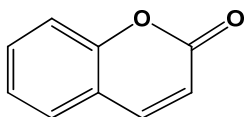
Amil cinamal, cinamaldehído, citral, hidroxi-citronelal, hexil cinamaldehído, alfa-isometil ionona, Lilial®, Lyral®

**Amil cinamal****Cinamaldehído****Citral****Hidroxi-citronelal****Hexil cinamaldehído****α-isometil ionona****Lilial®****Lyral®****Esteres y lactonas:**

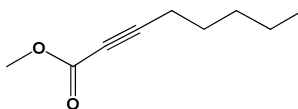
Benzoato de bencilo, cinamato de bencilo, salicilato de bencilo, cumarina y octanoato de 2-metilo

**Benzoato de bencilo****Cinamato de bencilo****Salicilato de bencilo**

Introducción



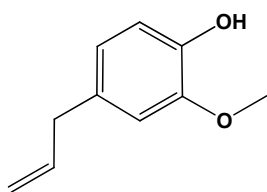
Cumarina



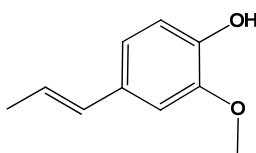
Octanoato de 2-metilo

Fenoles y Éteres:

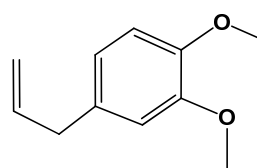
Eugenol, isoeugenol y metileugenol



Eugenol



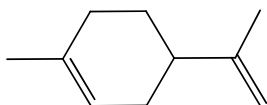
Isoeugenol



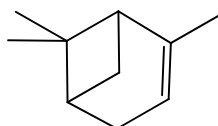
Metileugenol

Hidrocarburos cíclicos:

Limoneno y pineno



(d)-Limoneno



α-Pineno

También algunas de las fragancias alérgenas son terpenos: geraniol, linalol, citronelol, y farnesol. Estos alérgenos se encuentran en algunos aceites esenciales (Bakkali et al., 2008).

3.2 Aplicaciones

Los alcoholes alifáticos son ampliamente utilizados en productos de consumo, limpieza del hogar y PCPs. Normalmente, los alcoholes alifáticos con una longitud de cadena de C_{10} y superiores se aplican en productos como detergente para ropa, suavizantes y limpiadores de superficies. En los PCPs se suelen emplear los alcoholes de cadena larga lineal, por ejemplo, productos que contienen alcoholes C_{14} , C_{16} , C_{18} (Veenestra et al., 2009). Estos se usan en productos como champús, acondicionadores, gel y mousse, productos de limpieza, jabones líquidos, lociones y cremas para la piel, desodorantes, cosméticos para los ojos y la cara, maquillaje y fragancias, anti-transpirantes (Bickers et al., 2005; Letizia et al., 2005). El limoneno se usa como saborizante y fragancia (US EPA, 2009).

3.3 Uso potencial como pesticidas

Los aleloquímicos (compuestos producidos por plantas que provocan diversos efectos sobre otros organismos) de aceites esenciales se han clasificado como pesticidas verdes porque son biodegradables y predominantemente no-tóxico para los vertebrados. Con el objetivo de reducir el uso de insecticidas sintéticos, estos compuestos representan una opción para la eco-química del control de insectos (Tunaz et al., 2009; Kaufman et al., 2010; Gonzalez-Audino et al., 2011). En este sentido se ha investigado el efecto del metileugenol, entre otros, en *Chilo partellus* y se ha encontrado un $LD_{50} = 1069.4 \mu\text{g/larva}$, lo que demuestra que posee cierta toxicidad, también confirmada en el caso del linalol (Singh et al., 2009). De hecho, se ha observado actividad insecticida del linalol para *Rhyzopertha dominica* (Rozman et al., 2007). También se ha logrado el control de piojos con citronelol y geraniol con

mortalidad > 60% en adultos, mientras que el linalol y citral han mostrado mortalidad entre el 47 y el 53% (Gonzalez-Audino et al., 2011). En el control de mosquitos se ha informado entre los más tóxicos el citronelol ($LC_{50} = 48.55 \mu\text{g cm}^{-2}$) para *Aedes aegypti* y el geraniol ($LC_{50} = 31.88 \mu\text{g cm}^{-2}$) para el *Anopheles quadrimaculatus* (Kaufman et al., 2010). El citral, geraniol y eugenol tienen propiedades repelentes o tóxicas para algunos insectos y moluscos (Price y Berry, 2008). Se ha estudiado la efectividad del geraniol como nematocida. El geraniol produjo daños intestinales y cuticulares en larvas de *Anisakis simplex* (nematodo), a concentración de 46.90 mg/150 g de peso corporal (Hierro et al., 2004). También, se han estudiado los efectos del geraniol como insecticida (Xue et al., 2003) y del hexilcinamaldehído como acaricida (Matsunaga et al., 1992), así como la toxicidad de la α -isometil ionona en escarabajos *Callosobruchus maculatus* (Prajapati et al., 2001).

3.4 Exposición de las fragancias alérgicas en los seres humanos

Existen dos tipos de exposición en relación con la seguridad de las fragancias: el nivel de uso y la exposición sistémica total. Los efectos adversos potenciales están directamente relacionados con la dosis aplicada en la piel. Estos efectos adversos incluyen irritación de la piel, reacciones alérgicas, sensibilización, fotoirritación y fotoalergia. En este sentido Ford y colaboradores (Ford et al., 2000) propusieron el cálculo de la exposición cutánea para una fragancia específica en diez productos cosméticos de uso cotidiano.

En la Tabla II.3 se presenta la cantidad utilizada y la frecuencia de aplicación de una gama de productos cosméticos. El uso se expresa como una exposición diaria a pesar de que se basa en los productos

cosméticos que pueden ser utilizados en un período semanal. Por lo tanto, se ha estimado que una loción de cuerpo se puede utilizar 5 días por semana (es decir, 0.71 veces por día), una crema con fragancia o un producto de ducha cada dos días por semana (es decir, 0.29 veces al día), y un gel de ducha 15 días por período de 2 semanas (es decir, 1.07 veces por día). Las cifras de uso se han establecido como niveles típicos (Ford et al., 2000).

Tabla II.3. Cálculo de la exposición cutánea para una fragancia específica en productos cosméticos.

Tipo de producto cosmético	Gramos aplicados	Aplicaciones por día	Factor de retención	Mezcla/producto%	Ingrediente mg/kg/día
Loción corporal	8	0.71	1	0.004	0.0062
Crema facial	0.8	2	1	0.003	0.0013
Agua de colonia	0.75	1	1	0.08	0.0163
Crema con fragancia	5	0.29	1	0.04	0.0158
Antitranspirante	0.5	1	1	0.01	0.0014
Champú	8	1	0.01	0.005	0.0001
Productos de ducha	17	0.29	0.001	0.02	0
Gel de baño	5	1.07	0.01	0.012	0.0002
Jabón de tocador	0.8	6	0.01	0.015	0.0002
Espuma para cabello	5	2	0.01	0.005	0.0001
Total					0.0416*

*miligramos por kilogramo de peso corporal por día con base en un adulto de 60 kg (Adaptado de Ford et al., 2000)

Con estos cálculos de exposición se estiman las cantidades a las que una persona estándar puede estar expuesta de forma cotidiana a diversas fragancias. Esto es únicamente en lo que respecta a los productos de uso personal, además se debe considerar el uso de los productos de limpieza en el hogar y lavado de ropa. Es importante esta reflexión porque, al final, un porcentaje de estos productos se incorpora

al ciclo urbano del agua, con posibles repercusiones en la biota acuática.

En el estudio de Nardelli y colaboradores (Nardelli et al., 2009) en Bélgica se ha demostrado que el diez por ciento de los medicamentos tópicos contienen perfumes y que las alergias a medicamentos tópicos representan un tercio de los casos de alergia de contacto. Las mezclas de compuestos alérgenos, además de principios activos, excipientes y conservantes presentaron también 38 fragancias que dieron reacciones positivas en 48 productos específicos: vendas, antisépticos, anti-seborreicos, anti-inflamatorios no esteroides, anti-hemorroides, dermocorticosteroides tópicos y más. La mayoría de los pacientes alérgicos a las fragancias de los medicamentos tópicos han presentado dermatosis preexistentes e hipersensibilidad. Los perfumes, cuya presencia no se justifica en la actualidad en los medicamentos tópicos, son una causa de la dermatitis de contacto alérgica iatrogénica (Giordano-Labadie, 2011).

Existen evidencias que sugieren que hay una absorción significativa de las fragancias a través de la piel. Por ejemplo, una estimación conservadora de un estudio *in vitro* en piel humana indica que el 52% de cinamaldehído y 66 % de cinamil alcohol se absorben a través de la piel (Bickers et al., 2005).

Se puede concluir que el potencial de exposición a estos materiales en nuestra sociedad es muy alto, especialmente para aquellos productos que entran en contacto directo con la piel.

3.5 Distribución

Las rutas principales de absorción por parte del consumidor son a través de la piel, por inhalación o por ingestión (Klaschka, 2010).

Los análisis químicos revelan que las fragancias potencialmente alérgicas están presentes en el 15-100% de los productos cosméticos, incluyendo los desodorantes y los perfumes de lujo, y más a menudo en combinaciones de tres o cuatro alérgicos en cada producto. Esto implica que es difícil evitar la exposición, ya que los productos etiquetados como "libre de fragancias" pueden contener fragancias, ya sea por el uso de aromas e incluso por el uso de productos naturales (Johansen, 2003).

En un estudio realizado por Klaschka (Klaschka, 2010) se demuestra que más del 50% de los cosméticos del mercado alemán contienen al menos una de las 26 sustancias alérgicas por encima de los umbrales establecidos.

En un estudio de Buckley (Buckley, 2007) en productos de consumo británicos, las fragancias detectadas con mayor frecuencia fueron linalol (63%), limoneno (63%), citronelol (48%), geraniol (42%), Lilial[®] (42%) y hexyl cinamal (42%).

Se asume que la fuente principal de fragancias en el medio ambiente, después de su uso, es a través de las aguas residuales y por consecuencia en las plantas depuradoras de aguas residuales, en los cuerpos de agua (lagos, ríos, embalses) y en los lodos de las depuradoras. La fracción liberada de fragancias en el medio ambiente, suele ser bastante mayor que la fracción retenida en la piel, pelo, ropa u

otra superficie sólida. Por ejemplo, los productores de detergentes estiman que sólo el 1% del perfume permanece en el tejido, lo que significa que el 99% se libera en el medio ambiente (Klaschka y Kolossa-Gehring, 2007).

El aroma del jabón en polvo permanece en los tejidos, algunos días o unas pocas semanas. En la mayoría de los productos aromatizados no hay datos de caducidad. La estabilidad en el producto después de su aplicación es, por lo tanto, un rasgo indispensable de muchos compuestos con fragancia. Sin embargo, en los aspectos medioambientales, la estabilidad es una propiedad indeseable. De este modo, la mejora en la estabilidad de los aromas supone la descarga de compuestos con fragancia al medio ambiente con vida media más larga (Klaschka y Kolossa-Gehring, 2007).

Las fragancias son generalmente compuestos orgánicos semi-volátiles con un rango de presiones de vapor (10^{-10} - 10^{-5} Pa) y un amplio rango de solubilidad en agua (10^3 - 10^{-1} ml/L) (Simonich et al., 2000). Muchos de ellos son lipofílicos con $\log P_{ow} > 3$. Estas propiedades implican que el destino final de las fragancias puede ser cualquiera de los receptores del medio ambiente: agua, aire, sedimentos o biota. Incluso la contaminación del suelo es posible gracias a la difusión de lodos de aguas residuales. La descarga principal de fragancias que se emplean en los productos de cuidado personal y productos para el hogar es a través de la eliminación por el desagüe por parte de los consumidores. Los compuestos de los productos de cuidado personal y para el hogar, con una descarga constante, pueden suponer una concentración considerable en el medio ambiente incluso si los compuestos son degradables (Bickers et al. 2003).

La relevancia ambiental de las fragancias obedece a su persistencia, potencial de bioacumulación, propiedades toxicológicas y ecotoxicológicas, así como, su presencia en los sistemas ambientales en particular en los acuáticos. El limoneno, por ejemplo, no presenta grupos funcionales para su hidrólisis, y su anillo ciclohexeno y grupo etileno se sabe que son resistentes a la hidrólisis (US EPA, 1994). Por tanto, no se espera hidrólisis del limoneno en ambiente acuático ni terrestre. La vida media hidrolítica del limoneno se ha estimado >1000 días. El factor de bioconcentración del limoneno, calculado en base a su solubilidad en agua y su coeficiente de partición octanol/agua, es de 246-262, lo que sugiere que el limoneno se puede bioacumular en peces y otros organismos acuáticos (CICADS5, 1998).

3.6 Evaluación de la alergenicidad de las fragancias

La alergia de contacto es el resultado de dos fases. En una primera etapa, una sustancia química activa el sistema inmunológico específicamente después del contacto con la piel dando lugar a una *sensibilización sistémica*. Esta fase se llama de sensibilización o de inducción, y es permanente. El segundo paso es el inicio de los síntomas de enfermedad que se producen con la exposición a la sustancia que llevó a la sensibilización. Este segundo paso se llama elicitación. La sensibilización se produce por lo general a concentraciones más altas que las reacciones de desencadenamiento en personas sensibilizadas (Klaschka, 2010).

Las fragancias son una de las causas más frecuentes de reacciones alérgicas de contacto. El diagnóstico se realiza mediante pruebas de parche con una mezcla de ingredientes de fragancias. Alrededor del 10% de los pacientes evaluados con eczema, dan un resultado positivo

a la prueba de parches de reacción y las estimaciones más recientes muestran que del 1.7 al 4.1% de la población, en general, son sensibles a los ingredientes de la mezcla de perfumes (Johansen, 2003). Para observar la frecuencia de sensibilización de las 26 fragancias consideradas para su etiquetados de acuerdo con la normativa europea actual (Schnuch et al., 2007) se ha realizado un estudio durante cuatro períodos de seis meses, a partir de enero de 2003 hasta diciembre de 2004. Las 26 fragancias se probaron en parches, además de la serie estándar en un total de 21325 pacientes, el número de pacientes evaluados con cada una de las fragancias van desde 1658 hasta 4238. Se observaron las siguientes frecuencias de sensibilización (tasas en %, estandarizadas por sexo y edad): hidroxicitronelal (1.3), *isoeugenol* (1.1), cinamaldehído (1.0), farnesol (0.9), cinamil alcohol (0.6), citral (0.6), citronelol (0.5), geraniol (0.4), eugenol (0.4), cumarina (0.4), lillial (0.3), amil cinamil alcohol (0.3), cinamato de bencilo (0.3), alcohol bencílico (0.3), linalol (0.2), octanoato de 2-metilo (0.2), hexilcinamaldehído (0.1), limoneno (0.1), salicilato de bencilo (0.1), α -isometil ionona(0.1), benzoato de bencilo (0.0), anís alcohol (0.0). 1) Las sustancias con mayor frecuencia de sensibilización se han caracterizado por un considerable número de reacciones '++/+++'. 2) Las sustancias con baja frecuencias de sensibilización se caracterizan por un alto número de dudoso / irritante y un número bajo de reacciones más fuertes (++/+++). 3), entre las 26 fragancias hay algunas que son, con respecto a la alergia de contacto, de menor importancia, y algunas no tiene importancia en absoluto.

De acuerdo con un estudio reciente (Mathelier-Fusade, 2009) el porcentaje de sensibilización a los perfumes en los pacientes con sospecha clínica de alergia de contacto varía entre el 10 y el 16%, muy por delante de los conservantes.

La alergia de contacto es un área de la dermatología en constante evolución, debido a la naturaleza cambiante de la industria química, y más específicamente, la industria cosmética (Antignac et al., 2011). Otros posibles trastornos de la piel relacionados con el uso de fragancias incluyen dermatitis irritante, discromías y fotosensibilidad (fototoxicidad y fotoalergia) (Bickers et al., 2003).

En la Tabla II.4 se describen las fragancias de la norma europea de alérgenos estudiados en el presente trabajo de tesis, con nombres de la IUPAC y números de CAS. En las columnas (1) a (4) se muestra un resumen de diferentes clasificaciones de las propiedades alérgicas de estas fragancias de distintos grupos de expertos sobre la base de diferentes métodos. Las últimas columnas presentan datos de riesgo para organismos acuáticos, los rangos de volúmenes de producción y ejemplos de uso.

Tabla II.4. Descripción, clasificación, restricción, producción y uso de las fragancias alérgicas.

Nombre del compuesto/ número CAS	Clasificación por SCCNFP (1)	Grupo alérgico (Schnuch) (2)	Potencial alérgico (IKW/IVK) (3)	Valores umbral para humanos $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (4)	Restricciones de acuerdo con la Directiva de Cosméticos (5)	Clasificación y etiquetado (6)/datos sobre ecotoxicidad(7)	Volumen de producción HPVC(Alto)/LPVC (Reducido) (8)	Uso principal
Amil cinamal 122-40-7	Lista A	III (0.1)	Muy débil	23622	-	Irrita los ojos, las vías respiratorias y la piel; Posibilidad de sensibilización en contacto con la piel; WGK2	R	Jabón, productos de limpieza
Alcohol bencílico 100-51-6	Lista A	III (0.3)	Poco frecuente	sin datos	Uso autorizado en disolventes, perfumes y aromatizantes en una concentración máxima del 1% en el producto terminado	Noctivo por inhalación y por ingestión; WJK1; Peces, <i>Daphnia</i> , Algas, Bacterias	A	Conservante, disolvente
Cinamil alcohol 104-54-1	Lista A	II (0.6)	No es muy potente	4724	Nivel máximo de 0,8% en el producto terminado	Noctivo por ingestión: Posibilidad de sensibilización en contacto con la piel Irrita los ojos, las vías respiratorias y la piel; WGK2	R	Cosméticos, detergentes para ropa, jabón
Citral 5392-40-5	Lista A	II (0.6)	Muy débil	775	Sólo en combinación con el 25% de su peso de D-limoneno, o mezclado con terpenos cítricos o alfa-pineno.	Irrita la piel; Posibilidad de sensibilización en contacto con la piel; WGK1; Peces, <i>Daphnia</i> , Algas, Bacterias	A	Cosméticos, saborizante en alimentos
Eugenol 97-53-0	Lista A	II (0.4)	Muy débil	5905	-	Noctivo por ingestión; Irrita los ojos, las vías respiratorias y la piel; Posibilidad de sensibilización por inhalación y contacto con la piel; WGK1; Peces	R	Pasta de dientes, enjuague bucal, perfume, jabón, antisépticos
Hidroxicitronelal 107-75-5	Lista A	I (1.3)	No es muy potente	2953	Nivel máximo de 1% en el producto terminado	Irrita la piel; Riesgo de lesiones oculares graves; WGK1 <i>Daphnia</i> , Algas	R	Cosméticos, perfumes, jabones, insecticidas, antisépticos

Nombre del compuesto/ número CAS	Clasificación por SCCNFP (1)	Grupo alérgico (Schnuch) (2)	Potencial alérgico (IKW/IVK) (3)	Valores umbral para humanos µg/cm ² (4)	Restricciones de acuerdo con la Directiva de Cosméticos (5)	Clasificación y etiquetado (6)/datos sobre ecotoxicidad(7)	Volumen de producción HPVC(Alto)/ LPVC (Reducido) (8)	Uso principal
Isoeugenol 97-54-1	Lista A	I (1.1)	Potente	250	Nivel máximo de 0.02% en el producto terminado	Noctivo por ingestión; Irrita los ojos, vías respiratorias y la piel; Posibilidad de sensibilización en contacto con la piel; WGK2; Daphnia	R	Aceites esenciales, perfumes, cosméticos, jabones, detergentes
Alcohol cinamílico 101-85-9	Lista A	II (0.3)	Poco frecuente	23622	–	Irrita los ojos; WGK3 –	n.d.	Perfumes, jabones, cosméticos
Salicilato de bencilo 118-58-1	Lista A	III (0.1)	Poco frecuente	sin datos	–	Irrita los ojos, las vías respiratorias y la piel; WGK2 –	A	Cosméticos, aceites esenciales
Cinamaldehído 104-55-2	Lista A	I (1.0)	Potente	591	Sólo en combinación con el 50% de su peso de eugenol o d-limoneno u otras sustancias para prevención de la sensibilización	Irrita los ojos, las vías respiratorias y la piel; Posibilidad de sensibilización en contacto con la piel; WGK1; peces	A	Cosméticos
Cumarina 91-64-5	Lista A	II (0.4)	Poco frecuente	sin datos	–	Noctivo por inhalación, en contacto con la piel y por ingestión; Irrita los ojos, las vías respiratorias y la piel; WGK1; Peces, Daphnia	R	Cosméticos, perfumes, pesticidas

Nombre del compuesto/ número CAS	Clasificación por SCCNFP (1)	Grupo alérgeno (Schnuch) (2)	Potencial alérgeno (IKW/IVK) (3)	Valores umbral para humanos µg/cm² (4)	Restricciones de acuerdo con la Directiva de Cosméticos (5)	Clasificación y etiquetado (6)/datos sobre ecotoxicidad(7)	Volumen de producción HPVC(Alto)/LPVC (Reducido) (8)	Uso principal
Geraniol 106-24-1	Lista A	II (0.4)	Poco frecuente	3875	-	Irrita los ojos, las vías respiratorias y la piel Posibilidad de sensibilización en contacto con la piel; Tóxico para los organismos acuáticos, puede provocar a largo plazo efectos negativos en el medio ambiente acuático; Irrita los ojos, las vías respiratorias y la piel; WGK1; Peces	A	Perfumes, cuidado de la piel
Lyral® 31906-04-4	Lista A	I (2.3)	No es muy potente	4000	-	Posibilidad de sensibilización en contacto con la piel; WGK2	R	Cosméticos
Anis alcohol 105-13-5	Lista B	III (0.0)	Poco frecuente	3448	-	Nocivo por ingestión; Irrita los ojos, las vías respiratorias y la piel; WGK1; Peces	R	Perfume, saborizante
Cinamato de bencilo 103-41-3	Lista B	II (0.3)	Poco frecuente	4720	-	Tóxico para los organismos acuáticos, puede provocar a largo plazo efectos negativos en el medio ambiente acuático; WGK2 Daphnia	R	Perfumes, cosméticos
Farnesol 4602-84-0	Lista B	I (0.9)	Muy débil	2755	Como mínimo 96 % de pureza	WGK2 Peces, Daphnia	n.d.	Desodorantes,

Nombre del compuesto/ número CAS	Clasificación por SCCNFP (1)	Grupo alérgeno (Schnuch) (2)	Potencial alérgeno (IKW/IVK) (3)	Valores umbral para humanos µg/cm² (4)	Restricciones de acuerdo con la Directiva de Cosméticos (5)	Clasificación y etiquetado (6)/datos sobre ecotoxicidad(7)	Volumen de producción HPVC(Alto)/LPVC (Reducido) (8)	Uso principal
Lilial® 80-54-6	Lista B	II (0.3)	Muy débil	29525	–	Noctivo por ingestión; Irrita la piel; Tóxico para los organismos acuáticos, puede provocar a largo plazo efectos negativos en el medio ambiente acuático; WGK2 Peces, Daphnia, Bacterias	A	Cosméticos, productos de lavado (colada)
Linalol 78-70-6	Lista B	III (0.2)	Poco frecuente	13793	–	Irrita los ojos, las vías respiratorias y la piel; WGK1 Peces, Daphnia, Algas, Bacterias	A	Perfume
Benzoato de bencilo 120-51-4	Lista B	III (0.0)	Poco frecuente	20690	Concentración máxima autorizada 0.5% (calculada como ácido benzoico) en el producto terminado	Noctivo por ingestión; WGK2 Peces, Daphnia, Bacterias	A	insecticida antiparasitario, perfumes, plastificante
Citronelol 106-22-9	Lista B	II (0.5)	Poco frecuente	sin datos	–	Posibilidad de sensibilización en contacto con la piel; Tóxico para los organismos acuáticos, puede provocar a largo plazo efectos negativos en el medio ambiente acuático; Irrita los ojos, las vías respiratorias y la piel; WGK1, Peces, Daphnia, Algas, Bacterias	A	Aceites esenciales, desodorantes, aerosol para mosquitos
Hexilcinamaldehído 101-86-0	Lista B	III (0.1)	Poco frecuente	23622	–	Irrita los ojos, las vías respiratorias y la piel; WGK2 Provoca quemaduras	A	Aceites esenciales

Nombre del compuesto/ número CAS	Clasificación por SCCNFP (1)	Grupo alérgeno (Schnuch) (2)	Potencial alérgeno (IKW/IVK) (3)	Valores umbral para humanos µg/cm ² (4)	Restricciones de acuerdo con la Directiva de Cosméticos (5)	Clasificación y etiquetado (6)/datos sobre ecotoxicidad(7)	Volumen de producción HPVC(Alto)/LPVC (Reducido) (8)	Uso principal
Limoneno 5989-27-5	Lista B	III (0.1)	sin datos	sin datos	Para ser utilizado conjuntamente con antioxidantes, el límite máximo del contenido de peróxidos es 20 mmoles/litro	Inflamable; Irrita la piel; Posibilidad de sensibilización en contacto con la piel; Tóxico para los organismos acuáticos, puede provocar a largo plazo efectos negativos en el medio ambiente acuático; WGK2; Peces, Daphnia	A	Cosméticos, aromatizantes, insecticidas botánicos, productos de limpieza
Octanoato de 2- metilo 111-12-6	Lista B	III (0.2)	Muy débil	sin datos	-	Noxico por ingestión; Irrita los ojos, las vías respiratorias y la piel; WGK1	n.d.	Productos de lavado (colada)
α-Isometil ionona 127-51-5	Lista B	III (0.1)	Poco frecuente	70866	-	Noxico por inhalación, en contacto con la piel y por ingestión;	n.d.	Cosméticos, perfumes
Metil Eugenol 93-15-2		III					n.d.	Saborizante, trampas para insectos

(Adaptada de Klaschka, 2010)

(n.d. = no hay datos)

(-) No hay datos experimentales disponibles de las pruebas estándar

(1) Clasificación por SCCNFP. Lista A: fragancias, que de acuerdo a los conocimientos existentes son comunes y bien conocidos como alérgenos. Lista B: fragancias, que son menos frecuentes y por lo tanto menos documentados como alérgenos (SCCNFP, 1999).

(2) Grupos de alérgenos (Schnuch et al., 2007) *Grupo I*: alérgenos importantes. *Grupo II*: Claramente alérgenos, pero menos importante en términos de frecuencia de sensibilización. *Grupo III*: (Muy) poco frecuentes sensibilizadores o incluso no son sensibilizadores. () Frecuencias de sensibilización.

(3) Clasificación del potencial alérgeno de la IKW (German Cosmetic, Toiletory, Perfumery and Detergent Association): potente, no muy potente, débil, muy débil, poco frecuente (Pleschka, 2007).

(4) Umbrales Humanos de sensibilización para alérgenos obtenida por la combinación de datos de bases de datos de los umbrales humanos y ensayos de ganglios linfáticos EC3 (en µg/cm²) (Basketter et al., 2008; Wijnhoven et al., 2008).

(5) Algunas fragancias están sujetas a restricciones de acuerdo con la Directiva Cosmética (EEC, 1976; SCCNFP, 2000).

(6) Clasificación y etiquetado. Comentarios sobre riesgos de acuerdo con la Directiva 67/548/EEC (EEC, 1967) como se indica en las Hojas de Seguridad de los productos.

(7) Datos ecotoxicológicos disponibles para: peces, *Daphnia*, algas y bacterias son datos experimentales de pruebas estándar disponibles. Clasificación de Riesgos para el Agua WGK (Water Hazard Classification) de acuerdo con German Administrative Regulation on the Classification of Substances Hazardous to Waters into Water Hazard Classes (Anon, 2005).

(8) Productos químicos de alto volumen de producción (HPVC, más de 1000 toneladas por año en la UE); sustancias químicas de bajo volumen de producción (LPVC, menos de 1000 toneladas por año en la UE), de acuerdo con los datos de European Chemicals Bureau.

En la Tabla II.4, se observa que 11 de las 25 sustancias se producen a un nivel de más de 1000 toneladas por año en la Unión Europea. La mayoría de los compuestos de alto volumen de producción de esta lista son consideradas como menos importantes en términos de frecuencia de sensibilización (Grupo II) o como sensibilizadores raros o incluso inexistentes, o no sensibilizadores (Grupo III) (Schnuch et al., 2007), pero la exposición prolongada puede conducir a una alta prevalencia de algún efecto. Sólo el alérgeno cinamal se produce en grandes volúmenes. Los volúmenes de producción y ámbitos de aplicación pueden dar una idea acerca de los patrones de uso y la probabilidad de contacto con un determinado compuesto alérgeno.

En la clasificación y etiquetado de la Tabla II.4, se muestra que la mayoría de estas sustancias son clasificadas y etiquetadas como sustancias peligrosas de acuerdo con la Directiva 67/548/EEC (EEC, 1967). Sin embargo, no todos los alérgenos están clasificados como *puede causar sensibilización por contacto con la piel*.

La mayoría de las sustancias de la Tabla II.4 se clasifican como WGK 1 o compuestos WGK 2 de acuerdo con las clases de riesgo para el agua; esto indica que la mayoría de estas sustancias tienen un impacto negativo sobre el medio ambiente acuático. Por otra parte, la información sobre ensayos ecotoxicológicos estándar, muestra que no hay muchos resultados disponibles para la mayoría de estas sustancias para poder evaluar sus propiedades ecotoxicológicas.

Efectos alérgenicos

En el trabajo de Elahi y colaboradores (Elahi et al., 2004) se ha estudiado el proceso de sensibilización en la piel, del cinamaldehído, amil cinamal y cinamil alcohol, mediante ensayos inmunoquímicos *in*

vitro. Se ha establecido el mecanismo inicial de sensibilización de la piel de estos alérgenos.

Por su parte, en otro estudio realizado durante cinco años a 3065 pacientes con dermatitis de contacto, se ha ejecutado la prueba de parches usando una mezcla específica de fragancias (Turic et al., 2011). Los resultados muestran que 509 pacientes fueron alérgicos a la mezcla de fragancias. De esta muestra, en 157 pacientes se realizaron pruebas de parches con fragancias individuales, contenidas en la mezcla de fragancias: cinamaldehído, cinamil alcohol, eugenol, isoeugenol, geraniol, hidroxicitronelal y amil cinamil alcohol. Los alérgenos más frecuentes fueron isoeugenol 57.9%, eugenol 55.4% y cinamil alcohol 34.4%.

En otro estudio sobre la evaluación de la frecuencia de la alergia de contacto a las 26 fragancias alérgenas declaradas por la Unión Europea (van Oosten et al., 2009), se han examinado 320 pacientes con eczema supuestamente alérgicos a las fragancias o cosméticos mediante las pruebas de parche; Lyral® (3.1%) y cinamil alcohol (2.5%) fueron compuestos que más reacciones provocaron.

En un estudio para determinar la irritación provocada por algunas fragancias, se demostró que el citral y el geraniol son irritantes severos; el citronelol, el eugenol y el isoeugenol son moderadamente irritantes; mientras que el linalol, alcohol bencílico e hidroxicitronelal son levemente irritantes (Motoyoshi et al., 1979). El farnesol se ha confirmado como causante de dermatitis alérgica (Gilpin y Maibach, 2010), y se ha estudiado el mecanismo de sensibilización del hexilcinamaldehído (Chipinda et al., 2009). En otros estudios se ha confirmado el hexilcinamaldehído como sensibilizador (Boverhof et al., 2008; Woolhiser et al., 2000) y alérgeno (Gerberick et al., 1997; 2002).

Además, el hexilcinamaldehído presenta propiedades irritantes de la piel (Ehling et al., 2005).

3.7 Toxicidad

En esta sección se describen los efectos toxicológicos de las fragancias alérgicas estudiadas en el presente trabajo de Tesis. En la Tabla II.5 se resume la LD₅₀ (dosis que provoca mortalidad al 50% de la población) oral (excepto cuando se indique lo contrario) de las fragancias alérgicas en diversas especies.

Tabla II.5. LD₅₀ de las fragancias alérgicas.

Alérgeno	LD ₅₀	Animal/Especie	Referencia
α-Pineno	494 ppm	<i>Artemia salina</i>	Hogg et al. 2001
Limoneno	4.4-5.1 g/Kg	Rata	Tsuji et al., 1975
	5.6-6.6 g/Kg	Ratón	
Alcohol bencílico	1230 mg/Kg	Rata	Jenner et al., 1964
	1580 mg/Kg	Ratón	
Linalol	2790 mg/Kg	Rata	Jenner et al., 1964
Octanoato de 2-metilo	1530 mg/Kg	Rata	Opdyke, 1979
Citronelol	3450 mg/Kg	Rata	Opdyke, 1975
Citral	4960 mg/Kg	Rata	Jenner et al., 1964
Geraniol	3600 mg/Kg	Rata	Jenner et al., 1964
Cinamaldehído	0.54 mg cm ⁻³	<i>Acaro/Dermanyssus gallinae</i>	Na et al., 2011
	25.8 mg m ⁻²	<i>Acaro/ Dermatophagoides farinae</i>	Kim et al., 2008
	19.3 mg m ⁻²	<i>Acaro/ Dermatophagoides pteronyssinus</i>	
	2220 mg/Kg	Rata	Jenner et al., 1964
1160 mg/Kg	Cobaya		
2318 mg/Kg	Ratones		
	3350 mg/Kg	Ratas	Sporn et al., 1965
Hidroxicitronelal	5888 mg/Kg	Ratas	Basf, 2008
Anis alcohol	1780 mg/Kg	Ratón	Draize et al., 1948

Introducción

Alérgeno	LD ₅₀	Animal/Especie	Referencia
	1330 mg/Kg	Rata	
Cinamil alcohol	2000 mg/Kg	Rata	Sciencelab, 2005
	2675 mg/Kg	Ratón	
Eugenol	1.93 g/Kg	Ratas	Sober et al., 1950
	2680 mg/Kg	Rata	
	3000 mg/Kg	Ratón	Jenner et al., 1964
	2130 mg/Kg	Cobaya	
Metil eugenol	1069.4 µg/larva	Insecto/ <i>Chilo partellus</i>	Singh et al., 2009
	1560 mg/Kg	Rata	Jenner et al., 1964
Isoeugenol	2500 mg/kg	Ratones femeninos	Bidevkina et al., 2003
	1560 mg/Kg	Rata	
	1410 mg/Kg	Cobaya	Jenner et al., 1964
Coumarina	680 mg/Kg	Rata	Jenner et al., 1964
	202 mg/Kg	Cobaya	
α-iso metil ionona	4590 mg/Kg	Rata	Jenner et al., 1964
Lilial®	>5000 mg/Kg	Rata	IFF, 2011
Amil cinamal	3730 mg/Kg	Rata	Jenner et al., 1964
Lyral®	>5000 mg/Kg	Rata	IFF, 2011
Alcohol cinamílico	2000 mg/Kg	Rata	MSDS,2003
	2675 mg/kg	Ratón	
Farnesol	6000 mg/Kg	Rata	ProSciTech, 2010
Hexilcinamaldehído	3100 mg/Kg	Rata	TCI, 2005
	2300 mg/Kg	Ratón	
Benzoato de bencilo	43.7 mg m ⁻²	Acaro/ <i>Dermatophagoides farinae</i>	Kim et al., 2008
	41.9 mg m ⁻²	Acaro/ <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	
	50 mg m ⁻²	Acaro/ <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	Wongkamchai et al., 2005
Salicilato de bencilo	2230 mg/Kg	Rata	RIFM, 1970
Cinamato de bencilo	5530 mg/Kg	Rata	Jenner et al., 1964
	3760 mg/Kg	Cobayas	

(LD₅₀) Dosis letal 50: es aquella dosis que produciría la muerte del 50% de la población.

En la Tabla II.6 se presentan algunos efectos tóxicos de las fragancias alérgenas en diferentes organismos.

Tabla II.6. Efectos tóxicos de las fragancias alérgenas en diferentes organismos.

Alérgeno	Efecto tóxico/Especie	Referencia
Limoneno	Toxico/ <i>Blattellidae</i>	Phillips et Appel 2010
	toxicidad aguda<1mg/L/peces y <i>daphnia</i>	Haugaard, 1995
	Larvicida/ <i>Aedes aegypti</i>	Park et al., 2011
Linalol	Insecticida/ <i>Chilo partellus</i>	Singh et al., 2009
	Insecticida/ <i>Rhyzopertha dominica</i>	Rozman et al., 2007
	Insecticida/piojos	Gonzalez-Audino et al., 2011
	Antifúngico/ <i>Saprolegniaceae</i>	
	Toxico/ <i>Carassius auratus</i>	Chukanhom et al., 2005
	Toxico/ <i>Xiphophorus maculatus</i>	
Citronelol	Nematicida/ <i>Meloidogyne incognita</i>	Ding et al., 2007
	Insecticida/piojos	Gonzalez-Audino et al., 2011
Citral	Toxico/ <i>Penicillium digitatum</i>	Wolken et al., 2002
	Insecticida/piojos	Gonzalez-Audino et al., 2011
Geraniol	Nematicida/ <i>Anisakis simplex</i>	Hierro et al., 2004
	Insecticida/mosquitos	Xue et al., 2003
	Toxico/ <i>Penicillium digitatum</i>	Wolken et al., 2002
	Insecticida/piojos	Gonzalez-Audino et al., 2011
Anís alcohol	Nematicida/ <i>Caenorhabditis elegans</i>	Stadler et al., 1994
	Insecticida/moscas domésticas	Craig y Lichtenstein, 1979
	Actividad antimicrobiana	Yang et al., 2010
Eugenol	Insecticida/ <i>Rhizopertha dominica</i>	Ghimire et al., 2011
	Anestésico/ <i>Xenopus laevis</i>	Goulet et al., 2011
	Toxico/ <i>S. zeamais</i>	Coitinho et al., 2011
	Anestésico / <i>Leporinus macrocephalus</i>	Vidal et al., 2007
	Nematicida/ <i>Meloidogyne incognita</i>	Ding et al., 2007
	Termicida/ <i>C. formosanus</i>	Cornelius et al., 1997
Isoeugenol	Anestésico en Carpas/ <i>Cyprinus carpio</i>	Gladden et al., 2010
α-iso metil ionona	Escarabajos/ <i>Callosobruchus maculatus</i>	Prajapati et al., 2001
	Toxicidad/ratones	Galea et Zugravu, 1967
Hexilcinamaldehído	Acaricida/	Matsunaga et al., 1992
Benzoato de bencilo	Detectado en abejas	Seefeld, 2006

A continuación se describen estudios realizados sobre la toxicidad de las fragancias alérgenas.

Se ha investigado la toxicidad del cinamaldehído además de otros compuestos estructuralmente relacionados en ácaros mediante bioensayos de mortalidad en fase vapor. Los resultados se compararon con el acaricida diclorvos. El cinamaldehído posee una LD₅₀ comparable al diclorvos 0.30 mg cm⁻³; la conclusión del estudio es que el cinamaldehído y los compuestos similares estudiados son acaricidas potenciales para el control de *D. gallinae* (Na et al., 2011).

En otro estudio se ha demostrado la toxicidad en ácaros *Dermatophagoides farinae* y *Dermatophagoides pteronyssinus* del polvo doméstico. Para *D. farinae* la toxicidad del cinamaldehído es LD₅₀ de 25.8 mg/m² y para el benzoato de bencilo LD₅₀ de 43.7 mg/m² ambos en 24 horas, mediante bioensayos de toxicidad en fase vapor. En el caso de *D. pteronyssinus* se ha obtenido para cinamaldehído una LD₅₀ de 19.3 mg/m² y para benzoato de bencilo de 41.9 mg/m² (Kim et al., 2008).

Se ha determinado que el anís alcohol presenta actividad nematocida para *Caenorhabditis elegans* (Stadler et al., 1994). En el estudio de Craig y Lichtenstein (Craig y Lichtenstein, 1979) se ha mencionado la actividad insecticida en moscas domésticas del anís alcohol. En un estudio de Yang y colaboradores (Yang et al., 2010) se analizó el extracto de *Illicium verum* (planta medicinal china) mediante espectrofotometría para determinar su eficacia antibacteriana y se encontró entre sus constituyentes el anís alcohol. Los autores del estudio concluyen que el anís alcohol muestra actividad antimicrobiana ante diferentes cepas clínicas.

En un estudio (Seefeld, 2006) para determinar los daños causados por el uso de plaguicidas en abejas, se han detectado 238 ingredientes

activos y metabolitos. En 2004, entre los contaminantes más frecuentemente detectados en abejas se ha encontrado el benzoato de bencilo (33%).

Se ha determinado la actividad acaricida del benzoato de bencilo y piretroides sintéticos contra *Dermatophagoides pteronyssinus*. El compuesto más tóxico fue el benzoato de bencilo ($LD_{50} = 50 \text{ mg/m}^2$) seguido del permethrin ($LD_{50} = 76.7 \text{ mg/m}^2$) y el de menor toxicidad fue el bifenthrin ($LD_{50} = 5157.8 \text{ mg/m}^2$) (Wongkamchai et al., 2005).

Se ha demostrado la toxicidad como insecticida del eugenol para *Rhizopertha dominica* (Ghimire et al., 2011). Se ha probado que el eugenol es tóxico para *S. zeamais* (gorgojo del maíz) (Coitinho et al., 2011).

Se ha señalado que el eugenol actúa como anestésico en ranas africanas (*Xenopus laevis*). Los resultados sugieren que hay manifestaciones de toxicidad en estos anfibios (Goulet et al., 2011). Se ha evaluado la capacidad anestésica del eugenol en *Leporinus macrocephalus*; se recomienda una concentración de eugenol de 37.5 mg/L para una anestesia rápida y segura (Vidal et al., 2007). Se ha evaluado la toxicidad del eugenol y del metileugenol (Miele et al., 2001), la toxicidad del eugenol en truchas y salmones (Stroh et al., 1998), así como la toxicidad del eugenol inhalado (Clark, 1988), sin resultados concluyentes.

Se ha determinado la actividad nematocida del eugenol y citronelol, entre otros compuestos, en *Meloidogyne incognita*. Los resultados muestran que el eugenol tiene mayor actividad nematocida que el citronelol (Ding et al., 2007).

Se ha evaluado el efecto anestésico del isoeugenol en carpas *Cyprinus carpio*. En concentraciones entre 40 y 80 mg/L se induce la anestesia en las carpas (Gladden et al., 2010). El LD₅₀ del isoeugenol en ratones femeninos vía oral es de 2500 mg/kg (clase III; moderadamente tóxico). Se demostró la acción irritante sobre la piel y la mucosa ocular en conejos (Bidevkina et al., 2003). Se ha estimado la toxicidad del metileugenol (Caujolle y Meynier, 1960).

Se ha investigado la actividad antifúngica del linalool en *Saprolegniaceae*. En el mismo estudio se investigó la toxicidad para los peces (*Carassius auratus*) y (*Xiphophorus maculatus*). Los resultados han demostrado que a 750 mg/L el linalool es tóxico para los hongos pero también para los peces (Chukanhom et al., 2005).

Se ha reportado la toxicidad del citral en ratas, y se ha observado que provoca alteraciones a dosis de 2137 mg citral/kg peso corporal (Dieter et al., 1993); además, su aplicación tópica provoca alteraciones en las glándulas sebáceas de ratas (Abramovici et al., 1983).

Se ha reportado la toxicidad del alcohol bencílico en recién nacidos (Menon et al., 1984; LeBel et al., 1988). Se ha observado una moderada actividad pediculicida en el alcohol bencílico, cinmaldehído y cinamato de bencilo (Yang et al., 2005).

La activación metabólica de la cumarina sugiere un riesgo potencial de toxicidad para los humanos (Zhuo et al., 1999). Se ha estudiado la toxicidad de la cumarina, por diversas técnicas (Price et al., 1996), así como los efectos de la cumarina en ratas (Carlton et al., 1996).

Se ha determinado la toxicidad de los componentes de algunos aceites esenciales en cucarachas; los resultados demuestran que el limoneno

es un compuesto tóxico para *Blattellidae* (Phillips y Appel 2010). Se ha estudiado el efecto del citral, geraniol y eugenol sobre termitas; el eugenol fue el termicida más efectivo contra *C. formosanus*, más que el geraniol y el citral (Cornelius et al., 1997).

Se ha evaluado la toxicidad de la α -isometil ionona en ratones (Galea y Zugravu, 1967). Se ha probado la toxicidad del citral y geraniol en *Penicillium digitatum* (moho verde) (Wolken et al., 2002).

El metileugenol es moderadamente tóxico. La dosis oral letal media fue de 810 a 1560 mg/Kg de peso corporal para ratas y 540 mg/Kg para ratones. El NOEL (No-Observed Effect Level) ha sido estimado en 30 mg/Kg/día (ECH/CPDG, 2001) pero también se ha reportado en 10 mg/Kg/día (Abdo et al., 2001).

Se ha evaluado la capacidad larvicida del limoneno en los mosquitos *Aedes aegypti*. Se ha propuesto que el limoneno es un agente potencial de control de las larvas de la citada especie (Park et al., 2011).

El limoneno presenta toxicidad aguda (<1mg/L) para organismos acuáticos (peces y *daphnia*) (Haugaard, 1995). No se conocen estudios sobre los efectos crónicos en los organismos acuáticos (CICADS5, 1998).

Citotoxicidad, mutagenicidad, teratogenicidad y neurotoxicidad

Las fragancias pueden ser responsables de efectos nocivos para la salud. En la literatura científica se discute sobre el efecto de las fragancias individuales o mezclas complejas, como los aceites naturales y su relación con afectaciones como dolores de cabeza o migraña,

asma, neurotoxicidad, carcinogenicidad, teratogenicidad, alteración endocrina o inducción de efectos nocivos psicológicos o de otro tipo (Klopman y Chakravarti, 2003; Griffiths, 2005; Laws et al., 2006; Papa et al., 2009; Groux y Cottrez, 2011).

Se ha encontrado que el eugenol presenta citotoxicidad y una potente actividad de eliminación de radicales libres; también el metileugenol exhibe estas características aunque en menor grado (Park, 2006). Estos resultados indican que el OH fenólico en el eugenol puede desempeñar una función crucial tanto en la citotoxicidad como en la actividad de los radicales libres. El mecanismo del estrés oxidativo y el metabolismo hepático del eugenol se asemejan a los del bromobenceno.

Se ha demostrado los efectos hepatotóxicos del eugenol en cultivos de células de hígado de ratas (Thompson et al., 1998) y en ratones (Mizutani et al., 1991a; 1991b). El eugenol tiene actividad metabólica en hepatocitos y efectos citotóxicos (Thompson et al., 1991; Thompson et al., 1989b). Se ha evaluado y confirmado la citotoxicidad del eugenol (Babich et al., 1993; Meryon et al., 1988). Se ha realizado un ensayo para determinar la citotoxicidad del eugenol *in vitro* (Kasugai et al., 1990). Se ha estudiado el metabolismo y los efectos adversos de eugenol en leucocitos humanos. Se ha concluido que puede interferir potencialmente y afectar negativamente las funciones vitales de los leucocitos (Thomson et al., 1989a).

Se ha evaluado la teratogenicidad del isoeugenol en ratas. Para la toxicidad materna se ha reportado el LOAEL (Lowest Observed Adverse Effect Level) de 250 mg / kg / día basado principalmente en reducción de peso corporal y en el peso gestacional. En cuanto a la toxicidad en el desarrollo se ha reportado un LOAEL de 1000 mg/kg/día basado en el retardo del crecimiento intrauterino y el retraso en el desarrollo del

esqueleto. La toxicidad del desarrollo como NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) fue de 500 mg/kg/día (George et al., 2001).

Se ha descrito al lilial como mutágeno potencial y se sugieren sustitutos en cosméticos (oxazolidinas) (Huchel et al., 2010).

Se han estudiado las afectaciones neurológicas del alcohol bencílico (Benda et al., 1986). Se ha determinado que el alcohol bencílico causa deterioro neurológico (Hiller et al., 1986).

Se ha estudiado el mecanismo de hepatotoxicidad de la cumarina en ratas (Lake et al., 1994). Se ha determinado la toxicidad hepática de la cumarina en rata *in vivo* e *in vitro* (Ferryhough et al., 1994).

Se ha investigado la hepatotoxicidad de la cumarina (Uehara et al., 2008; Farinola y Piller, 2007; Kienhuis et al., 2006; Born et al., 2000). Se ha determinado la toxicidad y carcinogenicidad de la cumarina (Born et al., 1998). Se ha establecido que la cumarina presenta hepatotoxicidad potencial (Andrejak et al., 1998). Se ha comparado el efecto citotóxico de la cumarina y algunos derivados en cultivos de hepatocitos de hígado de humano, rata, ratón y conejo. Los hepatocitos de rata han sido los más sensibles a la toxicidad de la cumarina y los humanos los más resistentes (Ratanasavanh et al., 1996).

El metileugenol ha demostrado ser genotóxico y carcinógeno, tanto en ratones y ratas; induce diferentes tipos de tumores en el hígado, así como tumores neuroendocrinos. En las ratas se ha observado otros tipos de tumores como neoplasias en el antestómago, riñón, glándula mamaria, tejido subcutáneo, así como mesoteliomas (ECH/CPDG, 2001). El limoneno induce tumores renales en ratas (Dietrich y Swenberg, 1991).

El cinamaldehído tiene efectos tóxicos en el hígado de ratas dependientes de la dosis y tiempo de exposición (Gowder y Devaraj, 2008; 2010), y provoca afectaciones en fetos de rata por ingestión (Mantovani et al., 1989).

Los resultados sobre la carcinogenicidad potencial del citral en ratones no son concluyentes (Ress et al., 2003a; 2003b). El citral provoca anomalías en el bazo de embriones de rata a dosis de 125 mg/Kg de peso corporal (Nogueira et al., 1995). Se ha observado cambios en la fertilidad (degeneración de ovocitos) de ratas con la aplicación tópica del citral (Toaff et al., 1979).

Se ha investigado el mecanismo por el cual el farnesol induce apoptosis en células cancerosas (Fairn et al., 2007). El farnesol tiene efectos inhibitorios sobre el crecimiento y la viabilidad de una variedad de cultivos de células de origen neoplásico (Adany et al., 1994), pero es considerablemente menos citotóxico para las células derivadas de tejido normal. El efecto tóxico del farnesol ocurre con cierto grado de selectividad en función del origen celular (Yazlovitskaya y Melnykovych, 1995).

Se han determinado concentraciones de limoneno y pineno de 181.25 y 85.29 ppb en aguas residuales de una fábrica de transformación de cítricos (Catanzaro et al., 2011). En este estudio también se muestra la mutagenicidad potencial de esta agua residual que incluye además otros terpenos. Los resultados de los terpenos individuales no han mostrado mutagenicidad. Los autores recomiendan evaluar la genotoxicidad de la mezcla de todos los compuestos presentes en las aguas residuales provenientes de cítricos, ya que existen evidencias del

peligro potencial de estas aguas para el ambiente acuático (Catanzaro et al., 2011; Saverini et al., 2012).

Efectos fototóxicos

Se ha realizado un estudio para identificar los efectos fototóxicos en fragancias. Se evaluaron 43 fragancias *in vitro* con una prueba de fotohemólisis utilizando suspensiones de eritrocitos humanos expuestos a fuentes de radiación ultravioleta A o B en presencia de los compuestos. Los resultados muestran una hemólisis moderada para UVA-inducido (5-11%) para alcohol bencílico y amil cinamal, así como hemólisis moderada para UVB-inducido para hidroxicitronelal, cinamaldehído, cinamil alcohol y amil cinamal. Los efectos fototóxicos dependen de la concentración de los compuestos y la dosis administrada de UV. Los autores concluyen que no todas las fragancias experimentan efectos fototóxicos *in vitro* (Placzek et al., 2007).

Bibliografía

- Abdo K.M., Cunningham M. L., Snell M. L., Herbert R. A., Travlos G. S., Eldridge S.R., Bucher J. R. (2001) 14-week toxicity and cell proliferation of methyleugenol administered by gavage to F344 rats and B6C3F1 mice, *Food Chem Toxicol*, 39, 303-316.
- Abramovici A., Wolf R., Sandbank M. (1983) Sebaceous glands changes following topical application of citral, *Acta Derm Venereol*, 63(5), 428-31.
- Adany I., Yazlovitskaya E. M., Haug J. S., Voziyan P. A., Melnykovych G. (1994) Differences in sensitivity to farnesol toxicity between neoplastically- and non-neoplastically-derived cells in culture, *Cancer Lett*, 79(2), 175-9.
- Andrejak M., Gersberg M., Sgro C., Decocq G., Hamel J. D., Morin M., Gras V. (1998) French pharmacovigilance survey evaluating the hepatic toxicity of coumarin, *Pharmacoepidem Dr S*, 7 (Suppl. 1, European Society of Pharmacovigilance, Annual Meeting, 1997).
- Anon (2005) The Administrative Regulation on the Classification of Substances Hazardous to Waters into Water Hazard Classes (Verwaltungsvorschrift wassergefährdende Stoffe–VwVwS).
- Antignac E., Nohynek G. J., Re T., Clouzeau J., Toutain H. (2011) Safety of botanical ingredients in personal care products/cosmetics, *Food Chem Toxicol*, 49 (2), 324-341.
- Babich H., Stern A., Borenfreund E. (1993) Eugenol cytotoxicity evaluated with continuous cell lines, *Toxicol in Vitro*, 7(2), 105-9.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. (2008) Biological effects of essential oils – A review, *Food Chem Toxicol*, 46 (2), 446-475.
- BASF (2008) Safety data sheet, Hydroxycitronellal, pp4. http://www.basf.co.kr/02_products/04_finechemicals/cosmetics/data/MS_DS_%20Hydroxycitronellal_EN_20040603.pdf (consultada el 25 de noviembre de 2011)
- Basketter, D., Gerberick, F., Kimber I. (2008). Appendix A: LLNA/EC3 Validation–Submission ICCVAM Draft Background Review Document Use of the Murine Local Lymph Node Assay (LLNA) to Determine Skin Sensitization Potency Categories.
- Benda G. I., Hiller J. L., Reynolds J. W. (1986) Benzyl alcohol toxicity: impact on neurologic handicaps among surviving very low birth weight infants, *Pediatrics*, 77(4), 507-12.

- Bickers D., Calow P., Greim H., Hanifin J.M, Rogers A.E., Saurat J.H., Sipes I.G., Smith R.L., Tagami H. (2005) A toxicologic and dermatologic assessment of cinnamyl alcohol, cinnamaldehyde and cinnamic acid when used as fragrance ingredients: The RIFM expert panel, *Food Chem Toxicol*, 43 (6), 799-836.
- Bickers D.R., Calow P., Greim H. A., Hanifin J. M., Rogers A. E., Saurat J. H., Sipes I. G., Smith R. L., Tagami H. (2003) The safety assessment of fragrance materials, *Regul Toxicol Pharm*, 37, 218–273.
- Bidevkina M. V., Guglya E. B., Ivanov N. G., Migukina N. V. (2003) Isoeugenol [1-hydroxy-2-methoxy-4-(prop-1yl)benzene]- mixture of cis- and trans-isomers, *Toksikologicheskii Vestnik*, (6), 51-52.
- Born S. L., Caudill D., Smith B. J., Lehman-McKeeman L. D. (2000) In vitro kinetics of coumarin 3,4-epoxidation: application to species differences in toxicity and carcinogenicity, *Toxicol Sci*, 58(1), 23-31.
- Born S. L., Fix A. S., Caudill D., Lehman-McKeeman L. D. (1998) Selective Clara cell injury in mouse lung following acute administration of coumarin, *Toxicol Appl Pharm*, 151(1), 45-56.
- Boverhof D. R., Wiescinski C. M., Botham P., Lees D., Debruyne E., Repetto-Larsay M., Ladics G., Hoban D., Gamer A., Remmele M., Wang-Fan W., Ullmann L.G., Mehta J., Billington R., Woolhiser M.R. (2008) Interlaboratory validation of 1% pluronic I92 surfactant as a suitable, aqueous vehicle for testing pesticide formulations using the murine local lymph node assay, *Toxicol Sci*, 105(1), 79-85.
- Buckley D.A. (2007) Fragrance ingredient labelling in products on sale in the U.K., *Brit J Dermatol*, 157, 295-300.
- Carlton B. D., Aubrun J. C., Simon G. S. (1996) Effects of coumarin following perinatal and chronic exposure in Sprague-Dawley rats and CD-1 mice, *Fundam Appl Toxicol*, 30(1), 145-51.
- Catanzaro I., Avellone G., Marci G., Saverini M., Scalici L., Sciandrello G., Palmisano L. (2011) Biological effects and photodegradation by TiO₂ of terpenes present in industrial wastewater, *J Hazard Mater*, 185(2-3), 591-7.
- Caujolle F., Meynier D. (1960) The toxicity of methyl eugenol, the methyl isoeugenols, and of methyl dihydroeugenol, *Compt Rend*, 250, 1148-9.
- Chipinda I., Anderson S. E., Butterworth L. F., Beezhold D., Siegel P. D. (2009) Increased cell proliferation in spleen and lymph nodes peripheral to contact allergen application site, *Toxicology*, 257(3), 113-6.
- Chukanhom K., Borisuthpeth P., Hatai K. (2005) Antifungal activities of aroma components from *Alpinia galanga* against water molds,

Biocontrol Sci, 10(3), 105-109.

CICADS5 (1998) Concise international chemical assessment document no. 5, limonene, international programme on chemical safety, World Health Organization, Geneva.

Clark C. (1988) Acute inhalation toxicity of eugenol in rats, *Arch Toxicol*, 62(5), 381-6.

Coitinho R. L. B. C., Oliveira J. V., Gondim Junior M. G. C., Camara C. A. G. (2011) Toxicity by fumigation, contact and ingestion of essential oils in *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1885 (Coleoptera: Curculionidae), *Cienc Agrotec*, 35(1), 172-178.

Cornelius M. L., Grace, J. K., Yates J. R. III. (1997) Toxicity of monoterpenoids and other natural products to the *Formosan subterranean* termite (Isoptera: Rhinotermitidae), *J Econ Entomol*, 90(2), 320-325.

Craig M., Lichtenstein, E. P. (1979) Biologically active components of anise: toxicity and interactions with insecticides in insects, *J Agr Food Chem*, 27(6), 1217-23.

Dieter M. P., Goehl T. J., Jameson C. W., Elwell M. R., Hildebrandt P. K., Yuan J. H. (1993) Comparison of the toxicity of citral in F344 rats and B6C3F1 mice when administered by microencapsulation in feed or by corn-oil gavage, *Food Chem Toxicol*, 31(7), 463-74.

Dietrich D. R., Swenberg J. A. (1991) The presence of α_{2u} -globulin is necessary for d-limonene promotion of male rat kidney tumors, *Cancer Res*, 51(13), 3512-21.

Ding Q., Luo W. C., Xiao T., Niu H. T., Tian L. B. (2007) Toxicity comparison of thirteen phytochemicals to *Meloidogyne incognita*, *Zhiwu Ziyuan Yu Huanjing Xuebao*, 16(3), 35-39.

EC (2003) Directive 2003/15/EC of the European Parliament and of the Council of 27 February 2003 amending Council Directive 76/768/EEC on the Approximation of the Laws of the Member States Relating to Cosmetic Products. *Off J Eur Union* 66, 26–35.

Draize J.H., Alvarez E., Whitesell M.F., Woodard G., Hagan E.C., Nelson A.A. (1948) Toxicological investigations of compounds proposed for use as insect repellents, *J Pharmacol Expl Ther*, 93, 26-39.

ECH/CPDG (2001) European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General, Scientific Committee on Food SCF/CS/FLAV/FLAVOUR/4 ADD1 FINAL, Opinion of the Scientific Committee on Food on Methyleugenol (4-Allyl-1,2-dimethoxybenzene)(adopted on 26 September 2001).

EEC (1967) Council Directive 67/548/EEC as Amended by Commission Directive 2001/59/EC of 6 August 2001 Adapting to Technical Progress for the 28th time Council Directive 67/548/EEC on the Approximation of the Laws, Regulations and Administrative Provisions relating to the Classification, Packaging and Labelling of Dangerous Substances. Official Journal L 225, 12/8/2001

EEC (1976) Council Directive 76/768/EEC of 27 July 1976 on the Approximation of the Laws of the Member States Relating to Cosmetic Products. Off J L 262, 27/09/1976, 169-200

Ehling G., Hecht M., Heusener A., Huesler J., Gamer A. O., van Loveren H., Maurer T., Riecke K., Ullmann L., Ulrich P., Vandebriel R., Vohr H.W. (2005) An European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round, *Toxicology*, 212(1), 60-8.

Elahi E. N., Wright Z., Hinselwood D., Hotchkiss S. A. M., Basketter D. A., Pease C. K. S. (2004) Protein Binding and Metabolism Influence the Relative Skin Sensitization Potential of Cinnamic Compounds, *Chem Res Toxicol*, 17(3), 301-310.

EU (2007) Council Directive of July 27, 1976 on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products. 76/768/EEC. en:
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1976L0768:20070508:EN:PDF>

Fairn G. D., Macdonald K., McMaster C. R. (2007) A Chemogenomic Screen in *Saccharomyces cerevisiae* Uncovers a Primary Role for the Mitochondria in Farnesol Toxicity and Its Regulation by the Pkc1 Pathway, *J Biol Chem*, 282(7), 4868-4874.

Farinola N., Piller N. B. (2007) CYP2A6 polymorphisms: is there a role for pharmacogenomics in preventing coumarin-induced hepatotoxicity in lymphedema patients?, *Pharmacogenomics*, 8(2), 151-158.

Fernyhough L., Kell S. W., Hammond A. H., Thomas N. W., Fry J. R. (1994) Comparison of in vivo and in vitro rat hepatic toxicity of coumarin and methyl analogs, and application of quantitative morphometry to toxicity in vivo, *Toxicology*, 88(1-3), 113-25.

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 Pharm*, 31, 166-181.

Galea V., Zugravu E. (1967) Toxicological study of ionone and methyl naphthyl ketone, *Industria Alimentara* (Bucharest), 18(10), 464-5, 488.

George J. D., Price C. J., Marr M. C., Myers C. B., Jahnke G. D. (2001) Evaluation of the developmental toxicity of isoeugenol in Sprague-Dawley (CD) rats, *Toxicol Sci*, 60(1), 112-120.

Gerberick G. F., Cruse L. W., Miller C. M., Sikorski E. E., Ridder G. M. (1997) Selective modulation of T cell memory markers CD62L and CD44 on murine draining lymph node cells following allergen and irritant treatment, *Toxicol Appl Pharmacol*, 146(1), 1-10.

Gerberick G. F., Cruse L. W., Ryan C. A., Hulette B. C., Chaney J. G., Skinner R. A., Dearman R. J., Kimber I. (2002) Use of a B cell marker (B220) to discriminate between allergens and irritants in the local lymph node assay, *Toxicol Sci*, 68(2), 420-8.

Ghimire B., Ramaswamy K., Pasha A. (2011) Insecticidal and fungicidal activity of phosphorothioates of eugenol, *J Pure Appl Microbiol*, 5(1), 307-311.

Gilpin S., Maibach H. (2010) Allergic contact dermatitis caused by farnesol: clinical relevance, *Cutan Ocul Toxicol*, 29(4), 278-287.

Giordano-Labadie F. (2011) Composants parfumés. Nouvelles sources d'exposition aux allergènes de la batterie standard Fragrances, *Rev Fr Allergol*, 51 (3), 306-309.

Gladden J. N., Brainard B. M., Shelton J. L., Camus A. C., Divers S. J. (2010) Evaluation of isoeugenol for anesthesia in koi carp (*Cyprinus carpio*), *Am J Vet Res*, 71(8), 859-866.

Gonzalez-Audino P., Picollo M. I., Gallardo A., Toloza A., Vassena C., Mougabure-Cueto G. (2011) Comparative toxicity of oxygenated monoterpenoids in experimental hydroalcoholic lotions to permethrinresistant adult head lice, *Arch Dermatol Res*, 303(5), 361-366.

Goulet F., Vachon P., Helie P. (2011) Evaluation of the toxicity of eugenol at anesthetic doses in African clawed frogs (*Xenopus laevis*), *Toxicol Pathol*, 39(3), 471-477.

Gowder S., Devaraj H. (2008) Food flavor cinnamaldehyde-induced biochemical and histological changes in the kidney of male albino wistar rat, *Environ Toxicol Phar*, 26(1), 68-74.

Gowder S., Devaraj H. (2010) A review of the nephrotoxicity of the food flavor cinnamaldehyde, *Curr Bioact Compd*, 6(2), 106-117.

Griffiths, D. E. (2005) Psi-Screen, an in vitro toxicity test system: Applications in the bioassay of perfumes and fragrance chemicals, *Altern Lab Anim*, 33(5), 471-486.

Groux, H., Cottrez, F. (2011) Gene expression markers and their use in evaluating the sensitizing or irritant potential of a compound, Fr. Demande, FR 2957089 A1 20110909.

Haugaard J. (1995) Environmentally hazardous substances. D-Limonene, Dansk Kemi, 76(4), 7. Edited By Beek, Bernd.

Hierro I., Valero A., Diaz V., Gonzalez J. M., Navarro M. C. (2004) Larvicide activity of geraniol (monoterpenic derivate) against L3 larvae of *Anisakis simplex* s.l. Multidisciplinary for Parasites, Vectors and Parasitic Diseases, Proceedings of the European Multicolloquium of Parasitology, 9th, Valencia, Spain, July 18-23, 2004, 2, 263-266. Edited By: Mas-Coma, Santiago.

Hiller J. L., Benda G. I., Rahatzad M., Allen J. R., Culver D. H., Carlson C. V., Reynolds J. W. (1986) Benzyl alcohol toxicity: impact on mortality and intraventricular hemorrhage among very low birth weight infants, *Pediatrics*, 77(4), 500-6.

Hogg C.L., Svoboda K.P., Hampson J.B., Brocklehurst S. (2001) Investigation into the composition and bioactivity of essential oil from lovage (*Levisticum officinale* W.D.J. Koch), *Int J Aromather*, 11, 144-151.

Huchel U., Bunn R., Materne M., Faber W., Smyrek H., Pierik T. T., Rittler F, Bauer A, Dischmann M., Sauf S. et al (2010) Liliac substitutes for fragrances, Ger. Offen., DE 102009001570 A1 20100923.

IFF (2011) Material Safety Data Sheet, INTERNATIONAL FLAVORS & FRAGRANCES, 7.

IFRA (2011) International Fragrance Association
< <http://www.ifraorg.org/> >

Jenner, P. M., Hagan, E. C., Taylor J. M., Cook E. L., Fitzhugh O. G. (1964) Food flavorings and compounds of related structure. I. Acute oral toxicity, *Food Cosmet Toxicol*, 2(3), 327-43.

Johansen, J. D. (2003) Fragrance Contact Allergy: A Clinical Review, *Am J Clin Dermatol*, 4(11), 789-798.

Kasugai S., Hasegawa N., Ogura H. (1990) A simple in vitro cytotoxicity test using the MTT [3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide] colorimetric assay: analysis of eugenol toxicity on dental pulp cells (RPC-C2A), *Jpn J Pharmacol*, 52(1), 95-100.

Kaufman P. E., Mann R. S., Butler J. F. (2010) Evaluation of semiochemical toxicity to *Aedes aegypti*, *Ae. albopictus* and *Anopheles quadrimaculatus* (Diptera: Culicidae), *Pest Manag Sci*, 66(5), 497-504.

- Kienhuis A. S., Wortelboer H. M., Hoflack J. C., Moonen E. J., Kleinjans J. C. S., van Ommen B., van Delft J. H. M., Stierum R. H. (2006) Comparison of coumarin-induced toxicity between sandwich-cultured primary rat hepatocytes and rats in vivo: a toxicogenomics approach, *Drug Metab Dispos*, 34(12), 2083-2090.
- Kim H. K., Yun Y. K., Ahn Y. J. (2008) Fumigant toxicity of cassia bark and cassia and cinnamon oil compounds to *Dermatophagoides farinae* and *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Exp Appl Acarol*, 44(1), 1-9.
- Klaschka U. (2010) Risk management by labelling 26 fragrances? Evaluation of Article 10 (1) of the seventh Amendment (Guideline 2003/15/EC) of the Cosmetic Directive, *Int J Hyg Envir Heal*, 213(4), 308–320.
- Klaschka U., Kolossa-Gehring M. (2007) Fragrances in the Environment: Pleasant Odours for Nature?, *Env Sci Pollut Res*, 14 (1), 44–52.
- Klopman, G., Chakravarti S. K. (2003) Screening of high production volume chemicals for estrogen receptor binding activity (II) by the MultiCASE expert system, *Chemosphere*, 51(6), 461-468.
- Lake B. G., Evans J. G., Lewis D. F. V., Price R. J. (1994) Comparison of the hepatic effects of coumarin, 3,4-dimethylcoumarin, dihydrocoumarin and 6-methylcoumarin in the rat, *Food Chem Toxicol*, 32(8), 743-51.
- Laws, S. C., Yavanxay, S., Cooper R. L., Eldridge J. C. (2006) Nature of the Binding Interaction for 50 Structurally Diverse Chemicals with Rat Estrogen Receptors, *Toxicol Sci*, 94(1), 46-56.
- LeBel M., Ferron L., Masson M., Pichette J., Carrier C. (1988) Benzyl alcohol metabolism and elimination in neonates, *Dev Pharmacol Ther*, 11(6), 347-56.
- Letizia C.S., Cocchiara J., Lalko J., Lapczynski A., Api A.M. (2005) Fragrance material review on cinnamyl alcohol, *Food Chem Toxicol*, 43(6), 837-866.
- Ley General de Salud, 1984 (*Última Reforma DOF 10-06-2011*), capítulo IX, Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión, Estados Unidos Mexicanos.
- Mantovani A., Stazi A. V., Macri C., Ricciardi C., Piccioni A., Badellino E. (1989) Pre-natal (segment II) toxicity study of cinnamaldehyde in the Sprague-Dawley rat, *Food Chem Toxicol*, 27(12), 781-6.
- Mathelier-Fusade P. (2009) Allergie aux parfums: quels tests pour quels conseils? *Rev Fr Allergol*, 49, 366-370.

- Matsunaga S., Saito Y., Yoshida T., Urushizaki F., Shimamura H. (1992) Acaricides containing cinnamic acid derivatives and analogs for domestic uses, Jpn. Kokai Tokkyo Koho, JP 04149103 A 19920522.
- Menon P. A., Thach B. T., Smith C. H., Landt M., Roberts J. L., Hillman R. E., Hillman L. S. (1984) Benzyl alcohol toxicity in a neonatal intensive care unit. Incidence, symptomatology, and mortality, *Am J Perinatol*, 1(4), 288-92.
- Meryon S. D., Johnson S. G., Smith, A. J. (1988) Eugenol release and the cytotoxicity of different zinc oxide-eugenol combinations, *J Dent*, 16(2), 66-70.
- Miele M., Ledda B., Falugi C., Mazzel M. (2001) Methyleugenol and eugenol variation in *Ocimum basilicum* cv. Genovese Gigante grown in greenhouse and in vitro, *J Biol Res* (Naples, Italy), 77(4-6), 43-50.
- Mizutani T., Satoh K., Nomura H. (1991a) Hepatotoxicity of eugenol and related compounds in mice depleted of glutathione: structural requirements for toxic potency, *Res Commun Chem Path*, 73(1), 87-95.
- Mizutani T., Satoh K., Nomura H., Nakanishi K. (1991b) Hepatotoxicity of eugenol in mice depleted of glutathione by treatment with DL-buthionine sulfoximine, *Res Commun Chem Path*, 71(2), 219-30.
- Motoyoshi K., Toyoshima Y., Sato M., Yoshimura M. (1979) Comparative studies on the irritancy of oils and synthetic perfumes to the skin of rabbit, guinea pig, rat, miniature swine and man, *Cosmet Toiletries*, 94(8), 41-3, 45-8.
- MSDS (2003), Safety data for cinnamyl alcohol, http://msds.chem.ox.ac.uk/CI/cinnamyl_alcohol.html (consultada 25 de noviembre 2011).
- Na, Y. E., Kim S. I., Bang H. S., Kim B. S., Ahn Y. J. (2011) Fumigant toxicity of cassia and cinnamon oils and cinnamaldehyde and structurally related compounds to *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae), *Vet Parasitol*, 178(3-4), 324-329.
- Nardelli A., d'Hooghe E., Drieghe J., Dooms M., Goossens A. (2009) Allergic contact dermatitis from fragrance components in specific topical pharmaceutical products in Belgium, *Contact Dermatitis*, 60, 303-313.
- Nogueira A. C. M. A., Carvalho R. R., Souza C. A. M., Chahoud I., Paumgarten F. J. R. (1995) Study on the embryofeto-toxicity of citral in the rat, *Toxicology*, 96(2), 105-13.
- Opdyke D.L.J. (1975) Fragrance raw materials monographs, *Food Cosmet Toxicol*, 13(6), 757-758.
- Opdyke D.L.J. (1979) Monographs on fragrance raw materials, *Food Cosmet Toxicol*, 17(4), 375-381.

- Papa, E., Luini M., Gramatica P. (2009) Quantitative structure-activity relationship modelling of oral acute toxicity and cytotoxic activity of fragrance materials in rodents, *SAR QSAR Environ Res*, 20(7-8), 767-779.
- Park H. M., Kim J., Chang K. S., Kim B. S., Yang Y. J., Kim G. H., Shin S. C., Park I. K. (2011) Larvicidal activity of myrtaceae essential oils and their components against *Aedes aegypti*, acute toxicity on *Daphnia magna*, and Aqueous residue, *J Med Entomol*, 48(2), 405-410.
- Park, H. J. (2006) Toxicological studies on the essential oil of *Eugenia caryophyllata* buds, *Nat Prod Sci*, 12(2), 94-100.
- Phillips A. K., Appel A. G. (2010) Fumigant toxicity of essential oils to the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae), *J Econ Entomol*, 103(3), 781-790.
- Placzek M., Froemel W., Eberlein B., Gilbertz K. P., Przybilla B. (2007) Evaluation of phototoxic properties of fragrances, *Acta Derm-Venereol*, 87(4), 312-316.
- Pleschka S., (2007) Düfte: Emotionen und Allergien, *Allergie Konkret.*, 3,19–21.
- Prajapati V., Tripathi A. K., Aggarwal K. K., Khanuja S. P. S., Kumar S. (2001) Screening of some synthetic aroma chemicals for toxicity on the stored grain pest, *Callosobruchus maculatus*, *J Med Aromat Plant Sci*, 23(4), 624-629.
- Price D. N., Berry M. S. (2008) Neurophysiological Effects of Naturally Occurring Defensive Compounds on the Freshwater Snail *Planorbis corneus*: Comparison with Effects in Insects, *J Chem Ecol*, 34(8), 994-1004.
- Price R. J., Mistry H., Wield P. T., Renwick A. B., Beamand J. A., Lake B. G. (1996) Comparison of the toxicity of allyl alcohol, coumarin, and menadione in precision-cut rat, guinea-pig, *Cynomolgus* monkey, and human liver slices, *Arch Toxicol*, 71(1-2), 107-111.
- ProSciTech (2010) MATERIAL SAFETY DATA SHEET, <http://www.proscitech.com.au/cataloguex/msds/c099.pdf> (consultado 25 de noviembre de 2011).
- Ratanasavanh D., Lamiable D., Biour M., Guedes Y., Gersberg M., Leutenegger E., Riche C. (1996) Metabolism and toxicity of coumarin on cultured human, rat, mouse and rabbit hepatocytes, *Fund Clin Pharmacol*, 10(6), 504-510.

Ress N. B., Bristol D. W., Bucher J. R., Hailey J. R., Haseman J. K., Herbert R. A., Maronpot R. R., Orzech D. P., Peddada S. D., Rao G. N., Roycroft J. H. Smith C. S., Travlos G. S., Witt K. L. (2003a) NTP toxicology and carcinogenesis studies of citral (microencapsulated) (CAS No. 5392-40-5) in F344/N rats and B6C3F1 mice (feed studies), *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser* (505), 1-268.

Ress N. B., Hailey J. R., Maronpot R. R., Bucher J. R., Travlos G. S., Haseman J. K., Orzech D. P., Johnson J. D., Hejtmancik M. R. (2003b) Toxicology and Carcinogenesis Studies of Microencapsulated Citral in Rats and Mice, *Toxicol Sci*, 71(2), 198-206.

RIFM (1970) (Research Institute for Fragrance Material, Inc.), Acute oral toxicity studies in rats. RIFM report number 2734, July 1 (RIFM, Woodcliff Lake, NJ, USA).

Rozman V., Kalinovic I., Korunic Z. (2007) Toxicity of naturally occurring compounds of Lamiaceae and Lauraceae to three stored-product insects, *J Stored Prod Res*, 43(4), 349-355.

Saverini M., Catanzaro I., Sciandrello G., Avellone G., Indelicato S., Marci G., Palmisano L., (2012) Genotoxicity of citrus wastewater in prokaryotic and eukaryotic cells and efficiency of heterogeneous photocatalysis by, TiO_2 , *J. Photochem. Photobiol. B: Biol*, 108, 8-15.

SCCNFP (2000) Opinion Concerning the 1st update of the Inventory of Ingredients Employed in Cosmetic Products. Section II: Perfume and Aromatic Materials. SCCNFP/0389/00/Final.

SCCNFP, (1999) Opinion Concerning Fragrance Allergy in consumers. A Review of the Problem. Analysis of the Need for Appropriate Consumer Information and Identification of Consumer Allergens. SCCNFP 0017/98

Schnuch A., Uter W., Geier J., Lessmann H., Frosch P. (2007) Sensitization to 26 allergens to be labelled according to current European regulation. Results of the IVDK and review of the literature, *Contact Dermatitis* 57, 1–10.

Sciencelab (2005) Material Safety Data Sheet, Cinnamyl Alcohol MSDS, Sciencelab, Inc. 1.

Seefeld, F. (2006) Chemical detection of damage to honey bees caused by pesticides, *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* (Braunschweig, Germany), 58(2), 59-66.

Simonich S. L., Begley W.M., Debaere G., Eckhoff W. (2000) Trace Analysis of Fragrance Materials in Wastewater and treated Wastewater, *Environ Sci Technol*, 34, 959–965.

Singh R., Koul O., Rup P. J. Jindal J. (2009) Toxicity of some essential oil constituents and their binary mixtures against *Chilo partellus* (lepidoptera: pyralidae), *Int J Trop Insect Sci*, 29(2), 93-101.

Sober H. A., Hollander F., Sober E. K. (1950) Toxicity of Eugenol: Determination of LD₅₀ on Rats, *Proc Soc Exp Biol Med*, 73, 148-151.

Sporn, A., Dinu I. Stanciu V. (1965) The toxicity of cinnamaldehyde, *Igiena*, 14(6), 339-46.

Stadler M., Mayer A., Anke H., Sterner O. (1994) Fatty acids and other compounds with nematocidal activity from cultures of Basidiomycetes, *Planta Med*, 60(2), 128-32.

Stroh J., Wan M. T., Isman M. B., Moul D. J. (1998) Evaluation of the acute toxicity to juvenile Pacific Coho salmon and rainbow trout of some plant essential oils, a formulated product, and the carrier, *Bull Environ Contam Toxicol*, 60(6), 923-930.

TCI (2005) Material Safety Data Sheet, 2.
<https://www.vwrsp.com/msds/10/TCH/TCH0685-025ML.pdf> (consultado 25 de noviembre de 2011).

Thompson D. C., Barhoumi R., Burghard R. C. (1998) Comparative toxicity of eugenol and its quinone methide metabolite in cultured liver cells using kinetic fluorescence bioassays, *Toxicol Appl Pharm*, 149(1), 55-63.

Thompson D. C., Constantin-Teodosiu D., Moldéus P. (1991) Metabolism and cytotoxicity of eugenol in isolated rat hepatocytes, *Chem-Biol Interact*, 77(2), 137-47.

Thompson D., Constantin-Teodosiu D., Norbeck K., Svensson B., Moldeus P. (1989a) Metabolic activation of eugenol by myeloperoxidase in polymorphonuclear leukocytes, *Chem Res Toxicol*, 2(3), 186-92.

Thompson D., Norbeck K., Olsson L. I., Constantin-Teodosiu D., Van der Zee, J., Moldeus P. (1989b) Peroxidase-catalyzed oxidation of eugenol: formation of a cytotoxic metabolite(s), *J Biol Chem*, 264(2), 1016-21.

Toaff M. E., Abramovici A., Sporn J., Liban E. (1979) Selective oocyte degeneration and impaired fertility in rats treated with the aliphatic monoterpene, Citral, *J Reprod Fertil*, 55(2), 347-52.

Tsuji M., Fujisaki Y., Okubo A., Arikawa Y., Noda K., Ide H., Ikeda T. (1975) Studies on d-limonene, as gallstone solubilizer (V): Effects on development of rat fetuses and offspring, *Oyo Yakuri*, 10, 179-186.

Tunaz H., Er M. K., Isikber A. A. (2009) Fumigant toxicity of plant essential oils and selected monoterpenoid components against the adult German cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae), *Turk J Agric For*, 33(2), 211-217.

Turic P., Lipozencic J., Milavec-Puretic V., Kulisic S. M. (2011) Contact allergy caused by fragrance mix and *Myroxylon pereirae* (balsam of Peru)--a retrospective study, *Collegium Antropol*, 35(1), 83-7.

Uehara T., Kiyosawa N., Shimizu T., Omura K., Hirode M., Imazawa T., Mizukawa Y., Ono A., Miyagishima T., Nagao T., Urushidani T. (2008) Species-specific differences in coumarin-induced hepatotoxicity as an example toxicogenomics-based approach to assessing risk of toxicity to humans, *Hum Exp Toxicol*, 27(1), 23-35.

US EPA (1994) Reregistration Eligibility Decision (RED) Limonene. US Environmental Protection Agency, Prevention, Pesticides and Toxic Substances (Report No. EPA-738-R-94-034).

US EPA (2009); U.S. Environmental Protection Agency, Hazard Characterization Document, screening-level hazard characterization, Monoterpene Hydrocarbons Category.

US FDA (2007). US Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. Cosmetics. FDA Policy and Authority. <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/cos-pol.html>.

van Oosten E. J., Schuttelaar M. L., Coenraads P. J. (2009) Clinical relevance of positive patch test reactions to the 26 EU-labelled fragrances, *Contact Dermatitis*, 61(4), 217-223.

Veenstra G., Webb C., Sanderson H., Belanger S. E., Fisk P., Nielsen A., Kasai Y., Willing A., Dyer S., Penney D., Certa H., Stanton K., Sedlak R. (2009) Human health risk assessment of long chain alcohols, *Ecotox Environ Safe*, 72, 1016-1030.

Vidal L. V. O., Furuya W. M., Graciano T. S., Schamber C. R., dos Santos L. D., Soares C. M. (2007) Eugenol concentrations for deep anesthesia and acute toxicity in piavucu (*Leporinus macrocephalus*) juveniles, *Acta Sci, Biol Sci*, 29(4), 357-362.

Wijnhoven S.W.P., Ezendam J., Schuur A.G., van Loveren H., van Engelen, J.G.M., (2008) Allergens in Consumer Products RIVM Report 320025001.

Wolken W. A. M., Tramper J., Van der Werf M. J. (2002) Toxicity of terpenes to spores and mycelium of *Penicillium digitatum*, *Biotechnol Bioeng*, 80(6), 685-690.

Wongkamchai S., Rongsriyam K., Nochot H., Mahakittikun V., Sermsart, B., Choochote W., Kanjanopart K. (2005) Efficacy of various

synthetic pyrethroid-impregnated encasement materials against house dust mite under laboratory conditions, *Exp Appl Acarol*, 35(4), 293-300.

Woolhiser M. R., Munson A. E., Meade B. J. (2000) Comparison of mouse strains using the local lymph node assay, *Toxicology*, 146(2-3), 221-7.

Xue, R. D., Alí A., Barnard D. R. (2003) Laboratory evaluation of toxicity of 16 insect repellents in aerosol sprays to adult mosquitoes, *J Am Mosq Control Assoc*, 19(3), 271-274.

Yang J. F., Yang C. H., Chang H. W., Yang C. S., Wang S. M., Hsieh M. C., Chuang L. Y. (2010) Chemical composition and antibacterial activities of *Illicium verum* against antibiotic-resistant pathogens, *J Med Food*, 13(5), 1254-62.

Yang Y. C., Lee H. S., Lee S. H., Clark J. M., Ahn Y. J. (2005) Ovicidal and adulticidal activities of *Cinnamomum zeylanicum* bark essential oil compounds and related compounds against *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculicidae), *Int J Parasitol*, 35(14), 1595-1600.

Yazlovitskaya E. M., Melnykovych G. (1995) Selective farnesol toxicity and translocation of protein kinase C in neoplastic HeLa-S3K and non-neoplastic CF-3 cells, *Cancer Lett*, 88(2), 179-83.

Zhuo X., Gu J., Zhang Q. Y., Spink D. C., Kaminsky L. S., Ding X. (1999) Biotransformation of coumarin by rodent and human cytochromes P-450: metabolic basis of tissue-selective toxicity in olfactory mucosa of rats and mice, *J Pharmacol Exp Ther*, 288(2), 463-471.

4. Contaminantes con elevado volumen de producción

En este trabajo de Tesis también se ha evaluado una serie de contaminantes con elevada tasa de producción, los cuales por la amplitud y extensión de sus aplicaciones son susceptibles de encontrarse como contaminantes en las aguas. Concretamente se han considerado el benzotiazol, 4-*tert*-butilfenol, 2-fenilfenol y butóxido de piperonilo.

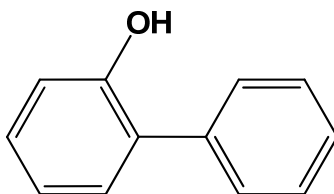
El programa de alto volumen de producción (HPV) se ha concebido como una iniciativa voluntaria destinada a desarrollar y hacer disponible la información de los efectos sobre la salud y el medio ambiente de una selección de productos químicos fabricados o importados en los Estados Unidos de Norteamérica en cantidades que superen los 453592 kilogramos (un millón de libras) por año (US EPA, 2010).

A continuación se describirán las características principales de esta serie de compuestos considerados en este trabajo de Tesis. En la Tabla II.7 se describen algunas propiedades de los mismos así como sus usos.

Tabla II.7. Propiedades de los contaminantes con elevado volumen de producción estudiados.

Compuestos	No.CAS	Punto de ebullición, °C	Densidad g/cm ³	pKa	pKow	Uso
Benzotiazol	95-16-9	193	1.24	1.2	2.01	Acelerador en vulcanización
4- <i>tert</i> -butilfenol	98-54-4	234	0.908	10.4	3.29	Antioxidante
2-fenilfenol	90-43-7	282	1.293	9.97	3.3	Germicida
Butóxido de piperonilo	51-03-6	180	1.05	-	4.8	Insecticida (sinérgico)

2-Fenilfenol



Es un compuesto orgánico que consiste en dos anillos de benceno unidos y un grupo hidroxilo fenólico. El 2-fenilfenol se utiliza como conservante de emulsiones aceite-agua y en la protección de pinturas resistentes al agua, también se usa como biocida en la industria textil, desinfectante de superficies en hospitales, hogares de ancianos, lavanderías comerciales, y plantas procesadoras de alimentos (Lee et al., 2005) y en productos, como pegamentos, aditivos para el hormigón y el cuero (Jonkers et al., 2009).

Su aplicación principal es la protección del almacenaje de frutas, especialmente cítricos, en la desinfección de material de almacenamiento y también como cera fungistática para el revestimiento de verduras (Appel, 2000).

Según el informe para establecer la lista prioritaria de sustancias para la evaluación de las alteraciones endocrinas en la Unión Europea (Groshart y Okkerman, 2000), en su anexo 10, se señala que el 2-fenilfenol es un producto químico de alto volumen de producción y disruptor endocrino potencial, no persistente, Categoría 2. El 2-fenilfenol se ha señalado como débilmente estrogénico (Körner et al., 2000).

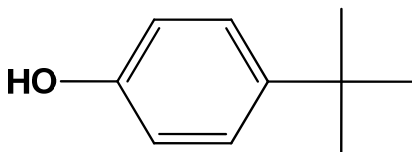
Se ha demostrado la carcinogenicidad de los biocidas 2-fenilfenol y su sal de sodio en la vejiga urinaria de ratas, alimentadas crónicamente a concentraciones de entre 0.5% y 4% de su dieta (Appel, 2000).

El valor reducido del coeficiente de partición agua-carbono orgánico ($\log K_{oc}$) de 2.5 indica adsorción moderada. En un ambiente acuático-*abiótico* el 2-fenilfenol se considera hidrolíticamente estable en el intervalo de pH de 4-9 y en ambiente acuático-*biótico* es biodegradable (disminución de 100% después de 10-14 días) (Johnson y Harvey, 2002).

En un estudio (Lee et al., 2005), el 2-fenilfenol se ha determinado en aguas residuales municipales en concentraciones máximas de 5.32 y 0.14 $\mu\text{g/L}$ en influente y efluente, respectivamente. En otro estudio (Körner et al., 2000) se ha encontrado en concentraciones de 3.6 y $<0.015 \mu\text{g/L}$ para influente y efluente, respectivamente, en aguas residuales municipales de una estación depuradora. Además, se ha detectado 0.047 $\mu\text{g/L}$ de 2-fenilfenol como concentración máxima en ríos (Bolz et al., 2001).

Jonkers y colaboradores (Jonkers et al., 2009) han encontrado una concentración media de 254 ng/L y 15 ng/L para influente y efluente respectivamente en aguas residuales de una estación depuradora y en agua de río ha encontrado una concentración media de 6.9 ng/L. Mientras que Guitart y Readman (Guitart y Readman, 2010) han informado 27 ng/L en aguas residuales industriales.

4-*tert*-Butilfenol



Se usa como intermediario en la fabricación de resinas fenólicas y de policarbonato. También, se usa como materia prima en elementos de

construcción. En muchas formulaciones de adhesivos la resina de p-*tert*-butilfenol-formaldehído (PTBP-FR) se utiliza como aglutinante (Zimerson y Bruze, 2002).

El 4-*tert*-butilfenol es abióticamente estable y relativamente biodegradable (98% después de 28 días) en agua. Es fotodegradable ya que presenta absorción en el espectro UV. Es bioacumulativo (log P_{ow} de 3.29 a 25 °C). Puede presentar toxicidad crónica para organismos acuáticos (OECD SIDS, 2000).

Se ha demostrado que una dosis tan baja como una décima parte de la concentración letal 50 (LC_{50} = 6.9 mg/L) de 4-*tert*-butilfenol causa alteración endocrina y cambios metabólicos en *Cyprinus carpio* en menos de dos semanas (Barse et al., 2006). Por otra parte, para rata se ha reportado una dosis letal 50 (LD_{50}) de 4000 mg/kg oral y una concentración efectiva media (EC_{50}) de 3.4 mg/L en 48h para *Daphnia* (OECD SIDS, 2000).

El 4-*tert*-butilfenol se considera moderadamente biodegradable y bioacumulativo, por lo que la exposición de la población en general a través del medio ambiente sería posible a través del agua de abastecimiento y aguas superficiales incluso a través de los peces que pueden acumular esta sustancia química (OECD SIDS, 2000).

El 4-*tert*-butilfenol se considera como un irritante de la piel, ojos y vías respiratorias. Es un posible sensibilizador de la piel humana ya que se tienen algunos resultados positivos en pruebas de parche, a pesar de resultados negativos en experimentos con animales (Zimerson y Bruze, 2002). Se observó despigmentación en la piel de diferentes animales y seres humanos expuestos a esta sustancia. Este cambio fue

probablemente inducido por la exposición no sólo a través de contacto directo, si no que también a través de inhalación o ingestión (OECD SIDS, 2000).

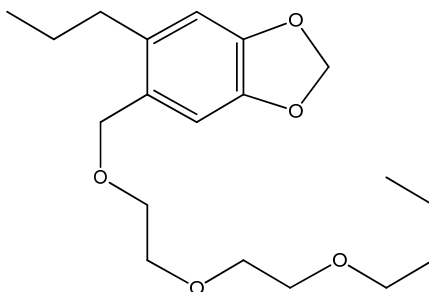
Según el informe para establecer alteraciones endocrinas (Groshart y Okkerman, 2000), en su anexo 7, se señala que el 4-*tert*-butilfenol es un producto químico de alto volumen de producción y disruptor endocrino potencial, no persistente, Categoría 2. En el anexo 7a (Efectos relevantes de disruptores endocrinos sobre la salud humana) se señala con efectos en células humanas *in vitro* (MCF-7), estimulación e incremento en la proliferación celular. En el anexo 7b (Efectos relevantes de disruptores endocrinos sobre la fauna) se mencionan sus efectos para la trucha en células *in vitro* (FHVSA) con estimulación en la proliferación celular y para el salmón sp. *in vitro*, incremento de la síntesis vitelogenina.

En cuanto a la presencia de estos compuestos en aguas naturales y residuales, la información disponible es escasa. Fu y colaboradores (Fu et al., 2007) encontraron concentraciones de entre 9.7 y 330 ng/L de *tert*-butilfenol en agua de río y de 2.5 a 32.1 ng/L en los sólidos suspendidos del agua de río. Por otra parte, se ha determinado el *tert*-butilfenol en concentraciones de 0.1–1 µg/L para agua residual cruda y de 0.01–0.1 µg/L para agua residual de un efluente secundario (Smital et al., 2011). Además, en otro estudio, se han encontrado concentraciones de 4-*tert*-butilfenol de 25.7 a 218.2 µg/L en una estación depuradora de agua residual (Ko et al., 2007)

Adicionalmente, en un estudio realizado para observar la degradación del bisfenol A, por ozonación a un pH ligeramente ácido enfatizando los parámetros de operación, cinética de reacción y subproductos de la

oxidación, se ha encontrado la formación de *p-tert*-butilfenol como subproducto (Gultekin et al., 2009).

Butóxido de piperonilo



El butóxido de piperonilo es un compuesto sinérgico que se utiliza en una amplia variedad de insecticidas. Las sustancias químicas sinérgicas son compuestos que carecen de efectos plaguicidas propios, pero que mejoran las propiedades de los ingredientes activos de los pesticidas. El butóxido de piperonilo se utiliza en insecticidas que contienen ingredientes activos como piretrinas y piretroides (Woudneh y Oros, 2006). Al aumentar la proporción de butóxido de piperonilo se disminuye la cantidad de piretrinas que se requiere para producir el mismo efecto. La actividad insecticida de los piretroides, también se mejora mediante la adición de butóxido de piperonilo y se incluye en los productos en aerosol para uso doméstico para el control de insectos voladores. Una proporción comercialmente rentable es de 5:1 hasta 10:1 de butóxido de piperonilo:piretroide. El butóxido de piperonilo se encuentra presente en unos 1500 productos registrados utilizados en salud pública, agricultura, etc. Se han estudiado sus propiedades inmuno y alérgico toxicológicas (Diel et al., 1999) y la US EPA lo clasifica como un carcinógeno del grupo C, es decir, un posible carcinógeno en humanos (US EPA, 2006).

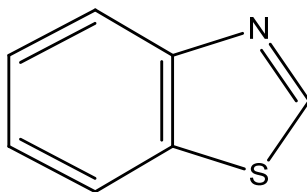
Se ha estudiado la toxicidad del butóxido de piperonilo en ratas y se ha encontrado que existen manifestaciones de toxicidad en hígado y riñones (Fujitani et al., 1992). También, se considera tóxico para el hígado en ratones (Fujitani et al., 1993). Se ha indicado que el butóxido de piperonilo induce tumores hepatocelulares en ratones (Muguruma et al., 2006; 2007), y efectos adversos en las funciones reproductivas, de desarrollo y comportamiento (Tanaka, 1992).

El butóxido de piperonilo reduce la tasa de biotransformación de los pesticidas con los que se asocia (Spurgeon et al., 2010).

Se han determinado concentraciones de butóxido de piperonilo en agua de una estación depuradora de entre 74 y 20 pg mL^{-1} , en aguas residuales de un colector urbano de 55 pg mL^{-1} y en aguas de un contenedor de lavado de naranjas de 7 pg mL^{-1} (Casas et al., 2007). Se han encontrado concentraciones de butóxido de piperonilo en sedimento del orden de 0.010 hasta 0.215 ng/g (Woudneh y Oros, 2006).

El butóxido de piperonilo también se ha usado en las evaluaciones de identificación de toxicidad en muestras de agua para indicar la toxicidad relacionada con los insecticidas organofosforados o piretroides (Amweg y Weston, 2007; Wheelock et al., 2004).

Benzotiazol



Es un compuesto aromático heterocíclico que consiste en un enlace 1, 3-tiazol unido a un anillo bencénico. Es un compuesto xenobiótico medioambientalmente persistente.

Los benzotiazoles se fabrican en todo el mundo para una amplia variedad de aplicaciones, entre las que destacan como agentes para la vulcanización en la industria del caucho (De Wever y Verachtert, 1997), como fungicidas en la producción de madera y cuero, como inhibidores de la corrosión y anticongelantes en los sistemas de enfriamiento industrial (Reddy y Quinn, 1997). Estas aplicaciones indican claramente que los benzotiazoles tienen un amplio espectro de actividad biológica. Al ser liberados por las fabricas de producción los benzotiazoles se han detectado en aguas residuales industriales (Kloepfer et al., 2005) y en varias matrices ambientales como suelo, aguas superficiales y acuíferos, vía sistemas de drenaje (Catallo y Junk, 2005). La limitada biodegradabilidad de los benzotiazoles, su potencial toxicidad para los microorganismos (De Wever et al., 1994) y su alergenicidad (Chipinda et al., 2007) y potenciales efectos mutagénicos, hacen que su presencia en el medioambiente sea preocupante.

Las partículas de desgaste de los neumáticos, y llantas de desecho son otras fuentes de benzotiazoles en el medio ambiente (Ni et al., 2008).

Los benzotiazoles son productos químicos industriales polares y biológicamente activos, presentes regularmente en las aguas residuales

municipales tratadas y poseen una considerable persistencia en las aguas superficiales (Kloepfer et al., 2005).

Se ha detectado benzotiazol en los lixiviados de rellenos sanitarios (Eggen, 2010; Barnes et al., 2004). Su polaridad y valor de $\log K_{ow}$ (1.99) contribuyen a su propagación en medios acuáticos (Barnes et al., 2004). Se han detectado concentraciones de hasta $130 \mu\text{g L}^{-1}$ de benzotiazol en aguas de infiltración procedentes de rellenos sanitarios junto con las benzotiazolonas (Schwarzbauer et al., 2002).

En efluentes de estaciones depuradoras de agua residual (EDAR) se han determinado concentraciones de benzotiazol de hasta 2629 ng L^{-1} (Jover et al., 2009). En otro estudio, se ha determinado una concentración media de benzotiazol de $2.26 \mu\text{g L}^{-1}$ en el efluente de depuradora (Kloepfer et al., 2005). Por otra parte, se ha encontrado una concentración de $1.04 \mu\text{g L}^{-1}$ de benzotiazol en agua residual sin tratamiento (Fries, 2011) y una concentración promedio 254 ng/L en agua de río (Ni et al., 2008). Esto confirma que las aguas residuales industriales es la principal vía por la cual estos compuestos entran en el medio acuático.

Bibliografía

Amweg E.L., Weston D.P. (2007) Whole sediment toxicity identification evaluation tools for pyrethroid insecticides: I. Piperonyl butoxide addition, *Environ Toxicol Chem*, 26, 2389–2396.

Appel K. E. (2000) The carcinogenicity of the biocide ortho-phenylphenol, *Arch Toxicol*, 74, 61-71.

Barnes K.K., Christenson S.C., Kolpin D.W., Focazio M.J., Furlong E.T., Zaugg S.D., Meyer M.T., Barber L.B. (2004) Pharmaceuticals and other organic waste water contaminants within a leachate plume downgradient of a municipal landfill, *Ground Water Monit Rem*, 24, 119-126.

Barse A.V., Chakrabarti T., Ghosh T.K., Pal A.K., Jadhao S.B. (2006) One-tenth dose of LC₅₀ of 4-*tert*-butylphenol causes endocrine disruption and metabolic changes in *Cyprinus carpio*, *Pestic Biochem Physiol*, 86 (3), 172-179.

Bolz U., Hagenmaier H., Korner W. (2001) Phenolic xenoestrogens in surface water, sediments, and sewage sludge from Baden-Württemberg, south-west Germany, *Environ Pollut*, 115, 291–301.

Casas V., Llompарт M., Garcia-Jares C., Cela R., Dagnac T. (2007) Effects of sample pretreatment and storage conditions in the determination of pyrethroids in water samples by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry, *Anal Bioanal Chem*, 387(5), 1841-1849.

Catallo W.J., Junk T. (2005) Transformations of benzothiazoles in estuarine sediments, *J Environ Qual*, 34, 1746–1754.

Chipinda I., Hettick J.M., Simoyi R.H., Siegel P.D. (2007) Oxidation of 2-mercaptobenzothiazole in latex gloves and its possible haptention pathway, *Chem Res Toxicol*, 20, 1084–1092.

De Wever H., De Moor K, Verachtert H. (1994) Toxicity of 2-mercaptobenzothiazole towards bacterial growth and respiration, *Appl Microbiol Biotechnol*, 42 (4), 631-635.

De Wever H., Verachtert H. (1997) Biodegradation and toxicity of benzothiazoles, *Water Res*, 31, 2673–2684.

Diel F., Horr B., Borck H., Savtchenko H., Mitsche T., Diel E. (1999) Pyrethroids and piperonyl-butoxide affect human T-lymphocytes in vitro, *Toxicol Lett*, 107(1-3), 65-74.

Eggen T., Moeder M., Arukwe A. (2010) Municipal landfill leachates: A significant source for new and emerging pollutants, *Sci Total Environ*, 408 (21), 5147-5157.

Fries E. (2011) Determination of benzothiazole in untreated wastewater using polar-phase stir bar sorptive extraction and gas chromatography–mass spectrometry, *Anal Chim Acta*, 689, 65–68.

Fu M., Li Z., Gao H. (2007) Distribution characteristics of nonylphenol in Jiaozhou Bay of Qingdao and its adjacent rivers, *Chemosphere*, 69 (7), 1009–1016.

Fujitani T., Ando H., Fujitani K., Ikeda T., Kojima A., Kubo Y., Ogata A., Oishi S., Takahashi H., Takahashi O., Yoneyama M. (1992) Sub-acute toxicity of piperonyl butoxide in F344 rats, *Toxicology*, 72(3), 291–298.

Fujitani T., Tanaka T., Hashimoto Y., Yoneyama M. (1993) Subacute toxicity of piperonyl butoxide in ICR mice, *Toxicology*, 83(1-3), 93–100.

Groshart Ch., Okkerman P.C. (2000) Towards the establishment of a priority list of substances for further evaluation of their role in endocrine disruption: - *preparation of a candidate list of substances as a basis for prioritysetting*. Final report. Annex 10: List of 564 substances with their selection criteria. Annex 7: Human health and wildlife relevant data on endocrine disruption included in the database on 146 substances evaluated in the Expert meeting, European Commission DG ENV.

Guitart C., Readman J. W. (2010) Critical evaluation of the determination of pharmaceuticals, personal care products, phenolic endocrine disruptors and faecal steroids by GC-MS and PTV-GC-MS in environmental waters, *Anal Chim Acta*, 658, 32–40.

Gultekin I., Valko I., Nilsun H.I. (2009) Degradation of BPA by ozonation, *J Adv Oxid Technol*, 12 (2), 242–248.

Johnson I., Harvey P. (2002) Study on the scientific evaluation of 12 substances in the context of endocrine disrupter priority list of actions, European Commission, WRc-NSF Ref: UC 6052.

Jonkers N., Kohler H. P. E., Dammshäuser A., Giger W. (2009) Mass flows of endocrine disruptors in the Glatt River during varying weather conditions, *Environ Pollut*, 157, 714–723.

Jover E., Matamoros V., Bayona J. M. (2009) Characterization of benzothiazoles, benzotriazoles and benzosulfonamides in aqueous matrixes by solid-phase extraction followed by comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry, *J. Chromatogr A*, 1216, 4013–4019.

Kloepfer A., Jekel M., Reemtsma T. (2005) Occurrence, sources, and fate of benzothiazoles in municipal wastewater treatment plants, *Environ Sci Technol*, 39 (10), 3792–3798.

Ko E. J., Kim K. W., Kang S. Y., Kim S. D., Bang S. B., Hamm S. Y., Kim D. W. (2007) Monitoring of environmental phenolic endocrine disrupting compounds in treatment effluents and river waters, Korea, *Talanta*, 73(4), 674-683.

Körner W., Bolz U., Sussmuth W., Hiller G., Schuller W., Hanf V., Hagenmaier H. (2000) Input/output balance of estrogenic active compounds in a major municipal sewage plant in Germany, *Chemosphere*, 40, 1131-1142.

Lee, H.B., Peart T.E., Svoboda M.L. (2005) Determination of endocrine-disrupting phenols, acidic pharmaceuticals, and personal-care products in sewage by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry, *J Chromatogr A*, 1094, 122-129.

Muguruma M., Nishimura J., Jin M., Kashida Y., Moto M., Takahashi M., Yokouchi Y., Mitsumori K. (2006) Molecular pathological analysis for determining the possible mechanism of piperonyl butoxide-induced hepatocarcinogenesis in mice, *Toxicology*, 228(2-3), 178-187.

Muguruma M., Unami A., Kanki M., Kuroiwa Y., Nishimura J., Dewa Y., Umemura T., Oishi Y., Mitsumori K. (2007) Possible involvement of oxidative stress in piperonyl butoxide induced hepatocarcinogenesis in rats, *Toxicology*, 236(1-2), 61-75.

Ni H. G., Lu F. H., Luo X. L., Tian H. Y., Zeng E.Y. (2008) Occurrence, phase distribution, and mass loadings of benzothiazoles in riverine runoff of the Pearl River Delta, China, *Environ Sci Technol*, 42, 1892-1897.

OECD SIDS (2000) Organisation for Economic Co-Operation and Development—Screening Information Data Sets P-TERT-BUTYLPHENOL, Initial Assessment Report (OECD-SIDS Report) for 10th SIAM, Japan March 15-17, pp, United Nations Environment Programme publications. (disponible en: <<http://www.chem.unep.ch/irptc/sids/OECD/SIDS/98544.pdf/>>).

Reddy C.M., Quinn J.G. (1997) Environmental chemistry of benzothiazoles derived from rubber, *Environ Sci Technol*, 31, 2847-2853.

Schwarzbauer J., Heim S., Brinker S., Littke R. (2002) Occurrence and alteration of organic contaminants in seepage and leakage water from a waste deposit landfill, *Water Res*, 36, 2275-2287.

Smital T., Terzic S., Zaja R., Senta I., Pivcevic B., Popovic M., Mikac I., Tollefsen K. E., Thomas K. V., Ahel M. (2010) Assessment of toxicological profiles of the municipal wastewater effluents using chemical analyses and bioassays, *Ecotox Environ Safe*, 74 (4), 844-851.

Spurgeon D. J., Jones Oliver A., Dorne J. L., Svendsen C., Swain S., Stürzenbaum S. R. (2010) Systems toxicology approaches for understanding the joint effects of environmental chemical mixtures, *Sci Total Environ*, 408(18), 3725-3734.

Tanaka T. (1992) Effects of piperonyl butoxide on F1 generation mice, *Toxicol Lett*, 60, pp. 83–90.

US EPA (2006) Eligibility Decision for Piperonyl Butoxide (PBO), United States Environmental Protection Agency, Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7508C), EPA 738-R-06-005.

US EPA (2010) U.S. Environmental Protection Agency, Hazard Characterization Document, Screening-level hazard characterization of high production volume chemicals, Benzothiazole- and Morpholine-Based Thiazoles Category 5 Chemicals.

Wheelock C.E., Miller J.L., Miller M.J., Gee S.J., Shan G., Hammock B.D. (2004) Development of toxicity identification evaluation procedures for pyrethroid detection using esterase activity, *Environ Toxicol Chem*, 23, 2699-2708.

Woudneh M. B., Oros D. R. (2006) Pyrethroids, pyrethrins, and piperonyl butoxide in sediments by high-resolution gas chromatography/high-resolution mass spectrometry, *J Chromatogr A*, 1135 (1), 71-77.

Zimerson E., Bruze M. (2002) Contact allergy to the monomers in p-tert-butylphenol formaldehyde resin, *Contact Dermatitis*, 47, 147–153.

5. Técnicas analíticas aplicadas a la determinación de contaminantes emergentes en agua

Actualmente, el desarrollo de metodologías rápidas, precisas, sensibles y exactas es un tema importante. A pesar del gran avance tecnológico, la mayoría de los instrumentos analíticos no son capaces de analizar las muestras a partir de las matrices directamente y, como resultado, la etapa de preparación de muestras es indispensable. Para el análisis de trazas de compuestos orgánicos esta etapa principalmente comprende la extracción, que sirve para aislar los compuestos de interés de la matriz, y finalmente la concentración de los compuestos objetivo para mejorar (enriquecer) y, al mismo tiempo, reducir los efectos de la matriz, es decir “limpiar la muestra”.

Las metodologías de análisis validadas convencionales, incluidas en las normativas, de muestras ambientales, generan una gran cantidad de residuos químicos, dando lugar a un gran impacto ambiental y humano. En algunas circunstancias, las sustancias químicas empleadas para el análisis resultan más tóxicas que la especie química a determinar. Adicionalmente, en cuanto a la cantidad de residuos o subproductos generados, en ocasiones superan en algunos órdenes de magnitud las cantidades de los analitos de interés ambiental.

El impacto ambiental negativo de las metodologías de análisis se ha reducido de tres maneras diferentes:

- a) Disminuyendo la cantidad de disolventes requeridos en el pre-tratamiento de muestras;
- b) reduciendo la cantidad y la toxicidad de los disolventes y reactivos empleados en la etapa de medición, especialmente por la automatización y la miniaturización, y;

c) mediante el desarrollo de metodologías alternativas de análisis directos que no requieren disolventes o reactivos.

La miniaturización supone un modo de evitar los efectos secundarios de los métodos analíticos, y ha sido objeto de un número significativo de esfuerzos en investigación. En este sentido, la combinación de las modernas técnicas de análisis con los avances en la microelectrónica y la miniaturización permite el desarrollo de potentes dispositivos de análisis para el control eficaz de los procesos y la contaminación.

En la aplicación de las técnicas que se presentan en el presente trabajo de tesis, se han puesto de manifiesto la eficacia y la versatilidad de los sistemas actuales de análisis y su potencial para reducir al mínimo el consumo de sustancias peligrosas y las cantidades de residuos generados durante los ensayos.

5.1 Extracción en fase líquida

La extracción en fase líquida (LLE) es una técnica de preparación de muestras aplicada en muchos métodos analíticos estandarizados. A pesar del uso extendido, esta técnica se considera tediosa, es un procedimiento en multi-etapas, supone un elevado consumo de tiempo y presenta problemas de formación de emulsiones que dificulta la automatización. Lo más importante de esta técnica es el uso de grandes cantidades de disolventes orgánicos para el análisis de trazas, lo que conlleva un alto riesgo para el personal del laboratorio y genera residuos peligrosos que requiere recursos para su tratamiento y disposición. Para superar estos inconvenientes en las últimas dos décadas se han desarrollado técnicas de extracción en fase líquida, que

son rápidas, eficientes y que elimina o disminuye el consumo de disolventes orgánicos tóxicos.

Las propuestas con mayor aplicación tienden a miniaturizar la extracción. Algunos ejemplos son:

- Microextracción en fase líquida en fibra hueca (Hollow-fiber liquid phase microextraction) (HF-LPME)
- Microextracción líquido-líquido dispersiva (Dispersive liquid-liquid microextraction) (DLLME)
- Extracción líquido-líquido en membrana microporosa (Microporous membrane liquid-liquid extraction) (MMLLE)
- Recientemente la microextracción-emulsificación asistida por ultrasonidos (Ultrasound-assisted emulsification microextraction, USAEME), la cual ha sido desarrollada por el grupo de investigación dónde se ha realizado el presente trabajo de Tesis.

5.2 Extracción en fase sólida

La extracción en fase sólida (SPE) es una técnica conveniente para evitar el uso de grandes cantidades de disolventes orgánicos en los pasos de pre-concentración y extracción. Se ha utilizado principalmente para el enriquecimiento de muestras de agua con ventajas sobre la extracción líquido-líquido (LLE), tales como:

- a) reducción en las cantidades de disolventes utilizados,
- b) extracciones sin inconvenientes por la formación de emulsiones,
- c) eficacia de extracción,
- d) facilidad de automatización.

La tendencia de la SPE es hacia la miniaturización para mejorar la eficiencia en el manejo de recursos, especialmente de disolventes. Entre las propuestas de microextracción en fase sólida destacan:

- Microextracción en fase sólida (Solid-phase microextraction) (SPME).
- Extracción en membrana con interfase de sorbente (Membrane extraction with sorbent interface) (MESI).
- Microextracción en fibra hueca con cubierta polimérica (Polymer-coated hollow fibre microextraction) (PC-HFME).
- Extracción adsorptiva con barra agitadora (Stir bar sorptive extraction) (SBSE).

5.3 Microextracción en fase sólida

El desarrollo de la microextracción en fase sólida (SPME) por Belardi y Pawliszyn (Belardi y Pawliszyn, 1989) ha resultado de gran relevancia en la preparación de muestras sin uso de disolventes. Se basa en la retención de los analitos, directamente de las muestras (por inmersión o espacio de cabeza), en una película delgada de una fase de extractante inmovilizada sobre la superficie de una fibra de sílice fundida. Los extractos se analizan por desorción mediante cromatografía.

La microextracción en fase sólida (SPME) es una técnica que no requiere disolventes y que extrae y concentra simultáneamente analitos orgánicos en una sola etapa.

Adicionalmente, su empleo es simple con un tiempo de procesamiento de muestras relativamente reducido, con amplia variedad de fases estacionarias disponibles y la capacidad de reusar las fibras y con la

posibilidad de combinar la extracción con derivatización de analitos polares. Por estas razones, la SPME es una selección interesante para muchas aplicaciones analíticas. Estos aspectos, entre otros, ofrecen ventajas ante técnicas convencionales como la extracción líquido-líquido (requiere considerables cantidades de disolventes) o la extracción en fase sólida (no es posible el reúso de la fase).

En la Figura II.1 se muestra el dispositivo empleado para realizar la microextracción en fase sólida (SPME).

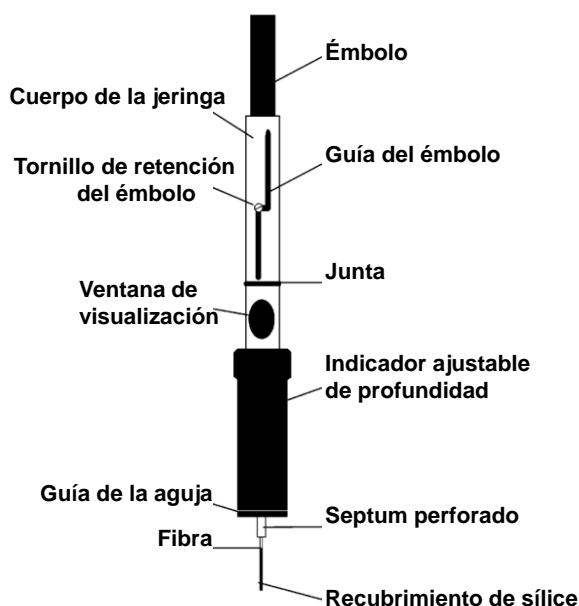


Figura II.1. Dispositivo comercialmente disponible para SPME

La eficiencia en el proceso de extracción depende de la constante de distribución del analito entre el recubrimiento y la matriz de la muestra. Este parámetro característico describe las propiedades de un recubrimiento y su selectividad para un analito. Los revestimientos se han desarrollado específicamente para una amplia variedad de

aplicaciones. En la Tabla II.8 se muestran ejemplos de los recubrimientos comercialmente disponibles.

Tabla II.8. Recubrimientos comercialmente disponibles para SPME (Supelco, Bellefonte, PA.)

Fase estacionaria	Aplicaciones recomendadas
75 µm/85 µm Carboxen/polidimetilsiloxano	Gases y compuestos con bajo peso molecular
100 µm polidimetilsiloxano	Volátiles
65 µm polidimetilsiloxano/divinilbenceno	Volátiles, aminas y compuestos nitro aromáticos
85 µm poliácridato	Semi-volátiles polares
7 µm polidimetilsiloxano	Compuestos con alto peso molecular no-polares
30 µm polidimetilsiloxano	Semi-volátiles no-polares
60 µm Carbowax	Alcoholes y compuestos polares
50/30 µm divinilbenceno/Carboxen en polidimetilsiloxano en una fibra "StableFlex "	Compuestos con aroma: volátiles y semi-volátiles
50/30 µm divinilbenceno/Carboxen en polidimetilsiloxano en una fibra "StableFlex "de 2 cm	Análisis de compuestos trazas
60 µm polidimetilsiloxano/divinilbenceno	Aminas y compuestos polares (solo para HPLC)

(Adaptado: SUPELCO, 2011)

La SPME posee una serie de ventajas en relación con otras técnicas de extracción convencionales: presenta un relativo bajo coste, se puede automatizar, requiere volúmenes reducidos de muestra y no requiere de disolventes orgánicos para llevar a cabo la preconcentración (Pawliszyn, 1997). Además, esta técnica incorpora las etapas de muestreo, extracción y enriquecimiento en un solo paso. El transporte de los analitos desde la matriz de la muestra hacia la fibra comienza en el momento en el que la fibra se expone a la misma. La extracción se considera completa cuando se alcanza el equilibrio de distribución, por

lo que no se trata de una técnica en la que se produzca, en general, la extracción exhaustiva de los analitos (Eisert y Pawliszyn, 1997).

El muestreo se puede realizar de tres diferentes formas; esto dependerá de las características de los analitos y de la muestra (Pawliszyn, 1997).

Extracción directa o por inmersión (SPME). La fibra se introduce en la muestra líquida, se produce la migración directa de los analitos desde la matriz hasta la fibra. Se prefiere cuando las muestras son relativamente sencillas y los analitos son escasamente volátiles. Para facilitar la extracción se recomienda la agitación para mejorar el transporte de la mayor parte los analitos en la disolución a las inmediaciones de la fibra. Para muestras gaseosas la convección y la difusión natural en el medio es suficiente para facilitar un equilibrio rápido.

Extracción en espacio de cabeza (HS-SPME). La fibra se expone al espacio de cabeza presente sobre la muestra, de modo que los analitos se extraen de la fase gaseosa que está en equilibrio con la muestra. Se recomienda para compuestos volátiles en matrices complejas y en matrices sometidas a tratamientos drásticos (modificaciones de pH, digestiones ácidas o básicas, etc.); este modo es selectivo con respecto a analitos de elevado peso molecular.

Extracción con membrana de protección. La fibra se protege mediante una membrana para evitar su deterioro al analizar muestras complejas por extracción directa.

La SPME depende de una serie de variables experimentales que se deben optimizar para incrementar la eficacia del proceso de extracción. La temperatura acelera la transferencia de los analitos desde la matriz a la fibra, aunque en condiciones de equilibrio, al ser la SPME un proceso

exotérmico, disminuye la cantidad de analito extraída. La fuerza iónica puede producir cambios en los coeficientes de reparto de un analito entre las diferentes fases implicadas en la SPME. El pH de la muestra afecta el equilibrio de disociación de analitos con grupos ácidos o básicos. La agitación de la muestra incrementa la difusión de los analitos desde la matriz a la fibra o al espacio de cabeza por lo que disminuye el tiempo requerido para alcanzar el equilibrio. Además se debe considerar el tiempo de extracción, el volumen de muestra, el volumen del espacio de cabeza, así como el tipo y espesor del recubrimiento de fibra.

5.4 Microextracción-emulsificación asistida por ultrasonidos

Los ultrasonidos se pueden usar para muchas aplicaciones en química analítica, incluyendo la emulsión para la preparación de muestras líquidas. La utilización de ultrasonidos es una opción para producir una emulsión, una dispersión de dos líquidos inmiscibles, uno de los cuales se dispersa en el otro en forma de finas gotas. Estas gotas dispersas pueden actuar como microextractantes líquido-líquido eficaces en la fase continua. Dado que la emulsión formada es un sistema termodinámicamente inestable, se rompe mediante centrifugación y es posible determinar los analitos en la fase orgánica mediante técnicas analíticas convencionales (Gaikwad y Pandit, 2008).

El mecanismo ampliamente aceptado para la emulsificación asistida por ultrasonidos se fundamenta en el efecto de cavitación (Lauterborn y Ohi, 1997). Se basa en la implosión de las burbujas generadas por el fenómeno de cavitación, que produce intensas ondas de choque en el líquido circundante y chorros de líquido de alta velocidad. Los

microchorros (microjets) pueden ocasionar la interrupción de las gotas en las inmediaciones del colapso de las burbujas y, por tanto, mejorar la emulsificación mediante la generación de gotas de menor tamaño en la fase dispersa inmediatamente después de la interrupción. Las gotas de tamaño sub-micrónico intensifican significativamente la superficie de contacto entre los dos líquidos inmiscibles y mejoran la transferencia de masa entre las fases (Luque de Castro y Priego-Capote, 2007a; 2007b).

La emulsificación por ultrasonidos se ve afectada por: el tiempo de irradiación, la potencia de irradiación y propiedades físico-químicas de la fase dispersa. El proceso de emulsificación se puede resumir de la siguiente manera:

- Un umbral de intensidad mínima necesaria para el inicio del proceso de emulsificación.
- Un aumento de la potencia de irradiación aumenta la calidad (estabilidad) de la emulsión.
- Un aumento del tiempo de irradiación, disminuye el tamaño de las gotas de la fase dispersa e incrementa la fase dispersada fraccional.
- Algunas propiedades físico-químicas del sistema como las fuerzas de tensión superficial participan en el proceso de emulsificación (Gaikwad y Pandit, 2008).

La miniaturización del proceso condujo al desarrollo en 2008 de la técnica de microextracción-emulsificación asistida por ultrasonidos (USAEME) por parte del grupo de investigación en el que he realizado esta Tesis (Regueiro et al., 2008).

La USAEME es una técnica de extracción y preconcentración que se fundamenta en la formación de una emulsión de un microvolumen de

disolvente orgánico (fase dispersa) en una matriz acuosa (fase continua) por acción de ultrasonidos. Mediante este proceso se lleva a cabo la transferencia de los analitos desde la muestra acuosa a las microgotas del disolvente orgánico que se encuentran dispersas en la misma. Ambas fases se separan mediante centrifugación y la fase orgánica se analiza, generalmente por cromatografía de gases (Regueiro et al., 2009). En la Figura II.2 se muestra la secuencia de la técnica de microextracción-emulsificación asistida por ultrasonidos.

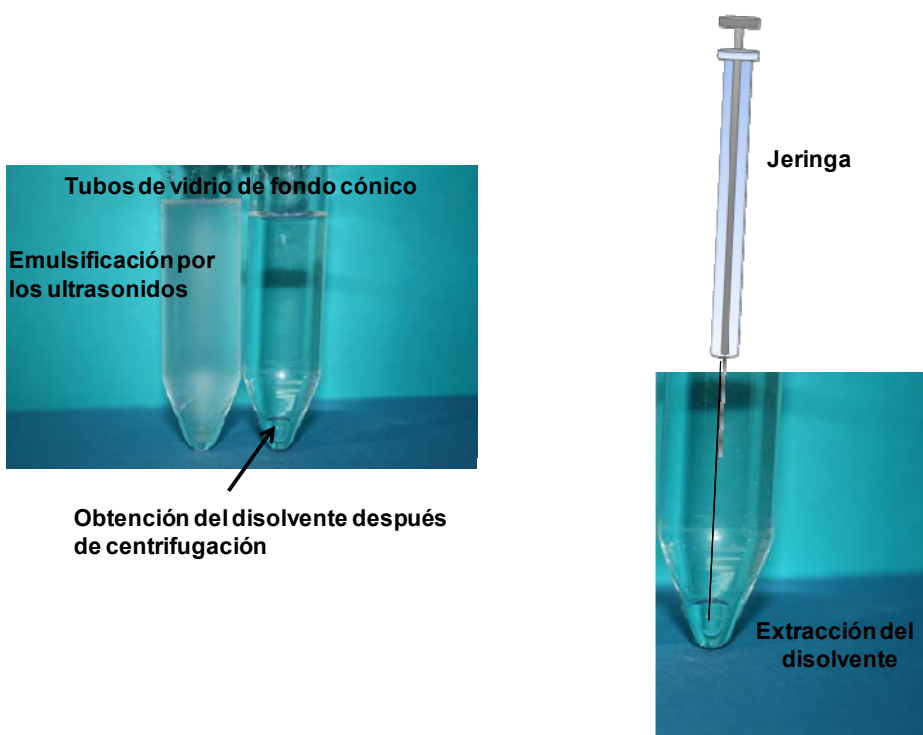


Figura II.2. Ejemplificación de la técnica de microextracción-emulsificación asistida por ultrasonidos.

La eficiencia del proceso de microextracción-emulsificación está influida por varios factores que es preciso optimizar entre los que destaca el disolvente utilizado (densidad superior a uno), la relación de volúmenes de fases (factor de preconcentración), tiempo de irradiación ultrasónica

(eficiencia en la transferencia de masa), la presencia de surfactantes en la muestra (afecta la emulsificación) y la fuerza iónica del medio.

La USAEME es una técnica rápida, sencilla y económica, que se puede aplicar para la extracción de compuestos orgánicos en muestras acuosas. Además, debido a los reducidos volúmenes de disolvente orgánico requeridos, generalmente inferiores a 200 μL , se trata de una técnica respetuosa con el medio ambiente (Regueiro et al., 2008).

En el trabajo de Regueiro y colaboradores (Regueiro et al., 2008) se evaluó la influencia de las principales variables que afectan a la eficiencia de la microextracción-emulsificación asistida por ultrasonidos mediante un diseño multifactorial para determinar nueve fragancias sintéticas de almizcle, seis ftalatos y lindano. Las extracciones se llevaron a cabo en 10 mL de muestra con 100 μL de cloroformo a una frecuencia de ultrasonidos de 40 kHz y 100 W de potencia por 10 minutos a 25 ± 3 °C; la emulsión se interrumpió por centrifugación a 5000 rpm durante 3 minutos, se utilizó cloroformo como extractante y no se empleó cloruro de sodio. El método propuesto se aplicó para el análisis de los compuestos de interés en diferentes tipos de muestras de agua (agua mineral embotellada, agua del grifo, agua de río, agua de piscina, agua de mar y el efluente e influente de una estación depuradora de aguas residuales). Las fragancias sintéticas de almizcle se encontraron en el agua de piscina y aguas residuales, predominando galaxolide y tonalide en concentraciones de pg mL^{-1} a ng mL^{-1} .

A partir de esta publicación esta técnica se ha aplicado para la determinación de diversos analitos y en diferentes matrices. En la Tabla II.9 se presenta la aplicación de la técnica USAEME para la determinación de diferentes analitos en muestras de agua.

Regueiro y colaboradores (Regueiro et al., 2009) desarrollaron un método de USAEME con derivatización *in situ* y determinación por cromatografía de gases-espectrometría de masas-masas (GC-MS/MS) para el análisis de parabenos, triclosan y fenoles relacionados, en muestras de agua. Este trabajo describe la primera aplicación simultánea de derivatización (acetilación usando anhídrido acético) y extracción por USAEME.

La USAEME también se ha aplicado en la determinación de metales trazas en muestras de agua. En la Tabla II.10 se describe la aplicación de USAEME para determinar metales. Adicionalmente la técnica de USAEME se ha aplicado para la determinación de diferentes compuestos en matrices diversas. En la Tabla II.11 se muestra la aplicación de la técnica de USAEME para diferentes compuestos y matrices.

Con esta amplia gama de posibilidades analíticas es importante seleccionar las que aporten beneficios significativos para su aplicación. En este sentido, se decidió aplicar la microextracción en fase sólida y la microextracción-emulsificación asistida por ultrasonidos para la realización del presente trabajo de tesis. Ambas técnicas proporcionan características de aplicación inmediata a un coste reducido.

Los antecedentes analíticos para cada uno de los grupos de sustancias considerados en este trabajo de Tesis se abordan, de forma más concreta, al inicio de los capítulos correspondientes de la sección III.

Tabla II.9. Aplicación de la técnica USAEME en agua.

Análitos	Disolvente	Volumen de disolvente	LOD	Detector	PF factor de preconcentración	REF
9 fragancias sintéticas de almizcle, 6 ftalatos y lindano	Cloroformo	100 µL	pg mL ⁻¹	GC-MS	100	Regueiro et al. (2008)
4 parabenos, triclosan y 2 fenoles	1,1,1-Tricloroetano	100 µL	3.90 - 12.5 pg mL ⁻¹	GC-MS/MS	100 a 200	Regueiro et al. (2009)
25 fragancias alérgicas reguladas	Cloroformo	100 µL	1 ng mL ⁻¹	GC-MS		Becerril-Bravo et al. (2010)
4 ftalatos (di-butil ftalato, butil bencil ftalato, diisocil ftalato, dioctil ftalato)	Tetracloruro de carbono	20 µL	1.0 - 1.2 µg L ⁻¹	GC-FID	490- a 530	Yan et al. (2010b)
16 hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs)	cloroformo	100 µL (65 µL) recuperado	0.001 - 0.036 µg L ⁻¹	GC-MS		Ozcan et al. (2010)
10 hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs)	Tolueno	14 µL	0.02-0.05 µg L ⁻¹	GC-FID	1776-2714	Saleh et al. (2009)
11 hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs)	Tween 80 y ciclohexano	Recupera 5 µL de ciclohexano	0.6-62.5 ng L ⁻¹	HPLC-FLD		Cheng et al. (2011)
6 bifenilos policlorados (PCBs)	Cloroformo	200 µL	14 ng L ⁻¹ (para PCB-153) -30 ng L ⁻¹ (para PCB-101).	GC-MS		Ozcan et al. (2009a)
4 éteres difenil polibromados (PBDEs); 2',4,4'-tetraBDE (BDE-47), 2,2',4,4,5-pentaBDE (BDE-99), 2,2',4,4',6-pentaBDE (BDE-100) and 2,2,4,4',5,5'-hexaBDE (BDE-153)	Cloroformo	100 µL	2 pg mL ⁻¹ , 2 pg mL ⁻¹ , 1 pg mL ⁻¹ , 1 pg mL ⁻¹ para BDE-47, BDE-100, BDE-99 y BDE-153, respectivamente	GC-MS	319	Fontana et al. (2009)

Análitos	Disolvente	Volumen de disolvente	LOD	Detector	PF factor de preconcentración	REF
18 pesticidas organoclorados (OCPs)	Cloroformo	200 µL	0.002 - 0.016 µg L ⁻¹	GC-µECD		Ozcan et al. (2009b)
7 pesticidas organofosforados (OPs)	150 µL de clorobenceno (como disolvente de extracción) y 100 µL de 1.0 × 10 ⁻² mol L ⁻¹ Trian X-100 como emulsificante		0.1 y 0.3 ng mL ⁻¹	HPLC-DAD	210 a 242	Wu C et al. (2010)
9 pesticidas organofosforados (OPPs)	Tolueno	20 µL	1 ng L ⁻¹ y 2 ng L ⁻¹	GC-µECD	330 a 699	Su y Jen (2010)
6 pesticidas carbamatos (mealcab, carbofuran, carbaryl, pirimicarb, isoprocarb y diethofencarb)	Tween 20 como emulsificante y clorobenceno y cloroformo como disolvente de extracción dual	150 µL de CHCl ₃ -C ₆ H ₆ Cl (1:1, v/v)	0.1–0.3 ng mL ⁻¹	HPLC-DAD	170 y 246	Wu Q et al. (2010)
4 benzouireas (BU) pesticidas, diflubenzuron, flufenoxuron, triflumuron y chlorfluazuron	1-hexil-3-metilimidazolium hexafluorofosfato ((C6MIM)[PF6])		0.21-0.45 mg L ⁻¹	HPLC		Zhou y Zhang (2010)
6 piretroides: Allethrin, cypermethrin, prallethrin, tetramethrin, transfluthrin, y imiprothrin	Tetraclorometano como extractante, acetona como dispersante	20 µL	0.11 - 0.30 µg L ⁻¹	HPLC UV-VIS	767-1033	Yan et al. (2010c)
4 herbicidas triazinas	1-Hexil-3-metilimidazolium hexafluorofosfato ((C6MIM)[PF6])	100 µL	0.36 - 1.41 µg L ⁻¹	HPLC		Wang et al. (2010)

Análitos	Disolvente	Volumen de disolvente	LOD	Detector	PF factor de preconcentración	REF
Residuos de diafenthuron	1-octil-3-metilimidazolium hexafluorofosfato ((OMIM)PF ₆) y acetronitrilo		0.8 mg L ⁻¹	LC-UV	358	Lu et al. (2010)
2,4,6-tricloroanisol (2,4,6-TCA)	Cloroformo	40 µL	0.2 ng L ⁻¹	GC-MS/MS	555	Fontana y Altamirano (2010)
3 clorofenoles (2-clorofenol, 2,4-diclorofenol y 2,6-diclorofenol)	Acetonitrilo	10 µL	6 - 23 ng mL ⁻¹	HPLC		Xu et al. (2007)
4 ácidos fenoxiacético clorados (CPAs)	Diclorometano reconstituido en mezcla metanol-agua (1:1)		0.67 - 1.50 ng mL ⁻¹	HPLC		Lin y Fuh (2010)
4 aminas aromáticas (2,4-dicloroanilina, 1-naphthylamine, 6-chloroaniline and N,N-dimethylaniline)	1-hexil-3-metilimidazolium hexafluorofosfato [C ₆ MIM][PF ₆]	60 µL	0.17-0.49 µg L ⁻¹	HPLC-UV		Zhou et al. (2009)
Lovastatin y simvastatin	[(C ₆ MIM)][PF ₆]	0.50 mL de IL	0.17 - 0.29 ng mL ⁻¹	HPLC-UV		Mao et al. (2009)

Tabla II.10 Aplicación de USAEME en la determinación de metales trazas en agua.

Metal	Disolvente	Volumen de disolvente	LOD	Detector	PF factor de preconcentración	REF
Cobre	1-(2-Piridilazo)-2-naftol (PAN) como agente quelante y tetracloruro de carbono como disolvente de extracción	80 µL	0.85 µg L ⁻¹	FAAS	14.3	Du et al. (2010a)
Cobre			0.76 µg L ⁻¹	FAAS		Chang et al. (2010)
Zinc	1-(2-Piridilazo)-2-naftol (PAN) como agente quelante y tetracloruro de carbono como disolvente de extracción		0.95 µg L ⁻¹	FAAS	12.5	Du et al. (2010b)
Zinc	1-Dodecano	90 µL	0.79 µg L ⁻¹	FAAS	76	Ma et al. (2010)
Cadmio	Tetracloruro de carbono	100 µL	0.91 µg L ⁻¹	FAAS	95	Ma et al. (2009)
Cadmio	1-Hexil-3-metilimidazolium hexafluorofosfato (HMIMPF ₆)	73 µL	7.4 ng L ⁻¹	ETAAS	67	Li et al. (2009)
Cromo (VI)	1-Hexil-3-metilimidazolium hexafluorofosfato ([Hmim][PF ₆])		0.07 ng mL ⁻¹	ETAAS		Chen et al. (2010)

FAAS: Espectrometría de absorción atómica de flama.

ETAAS: Espectrometría de absorción atómica electrotrémica.

Tabla II.11. Aplicación de USAEME en la determinación de diversos compuestos en matrices variadas.

Compuestos	Matriz	Disolvente	Volumen de disolvente	LOD	Detector	PF factor de preconcentración	REF
4 pesticidas organoclorados; clorpirifos, fenitroton, paration, metidation	Miel	Hexano	60 µL	0.03 y 0.47 ng g ⁻¹	GC-MS	167	Fontana et al. (2010a)
13 pesticidas organofosforados (OPPs) forato, diazinon, disolfotano, metil paration, sumition, clorpirifos, malatión, fenitron, profenfosfa, etión, fosfalona, azinfos-metil, coral	Tomate	Acetona y clorobenceno	60.0 µL	0.1 a 0.5 ng g ⁻¹	GC-MS		Bidari et al. (2011)
Cipermetrina y permetrina	Zumo de pera	Metanol y tetracloroetano	30 mL	3.1 y 2.2 mg kg ⁻¹	GC-FID	344 y 351	Du et al. (2010)
5 herbicidas simazina, atrazina, prometon, arnetrin y prometrin	Suelo	Clorobenceno	100 µL	0.1 a 0.5 ng g ⁻¹	HPLC con detección de red de diodos	145 y 222	Wu et al. (2010a)
6 oxazoles y 7 fungicidas de estrobilurina	Frutas y zumos	Undecanona	20 µL	0.006-0.075 ng mL ⁻¹	GC-MS (SIM)	140-1140	Viñas et al. (2010)
7 compuestos azufrados (metilmercaptoacetato, metil(metil)acetato, 2-metiltoetanol, 3-metilpropanol, 3-metilhexanol, 4-metil-4-metil-2-pentanona y hexanetil)	Vino	Diclorometano	150 µL	0.36-1.67 ng mL ⁻¹	GC-MS		Jofré et al. (2010)
Aminas biógenas octopamina (OCT), tiramina (TYR) y fenetilamina (PHE)	Cerveza	Butil-3-metilimidazolium hexafluorofosfato (C ₄ MIMPF ₆)	30 µL	0.25-50 ng mL ⁻¹	HPLC detección por fluorescencia		Huang et al. (2011)
3 aminas biógenas octopamina, tiramina y fenetilamina	Vino de arroz	Acetonitrilo y 1-octanol		0.02-5 ng mL ⁻¹	HPLC detección por fluorescencia		Huang et al. (2009)
4 éteres polibromados (PBDEs)	Sedimento	Acetona y tetracloruro de carbono	60 µL	0.02-0.06 ng g ⁻¹	GC-MS/MS		Fontana et al. (2010b)
Antidepresivos (fluoxetine, citalopram, y venlafaxine)	Orina y plasma humano	Undecanol	30 µL	3 µg L ⁻¹	HPLC-UV	174 y 316	Ebrahimzadeh et al. (2011)

Bibliografía

Becerril-Bravo E., Lamas J. P., Sanchez-Prado L., Lores M., Garcia-Jares C., Jimenez B., Llompert M. (2010) Ultrasound-assisted emulsification–microextraction of fragrance allergens in water, *Chemosphere*, 81, 1378-1385.

Belardi R.P., Pawliszyn J. (1989) The application of chemically modified fused silica fibers in the extraction of organics from water matrix samples and their rapid transfer to capillary columns, *Water Pollut Res J Can*, 24, 179-191.

Bidari A., Ganjali M. R., Norouzi P., Hosseini M. R. M., Assadi Y. (2011) Sample preparation method for the analysis of some organophosphorus pesticides residues in tomato by ultrasound assisted solvent extraction followed by dispersive liquid-liquid microextraction, *Food Chem*, 126(4), 1840-1844.

Chang Q., Zhang J., Du X., Ma J., Li J. (2010) Ultrasound-assisted emulsification solidified floating organic drop microextraction for the determination of trace amounts of copper in water samples, *Frontiers of Environmental Science & Engineering in China*, 4(2), 187-195.

Chen H., Du P., Chen J., Hu S., Li, S., Liu H. (2010) Separation and preconcentration system based on ultrasonic probe-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction for determination trace amount of chromium(VI) by electrothermal atomic absorption spectrometry, *Talanta*, 81(1-2), 176-179.

Cheng J., Matsadiq G., Liu L., Zhou Y. W., Chen G. (2011) Development of a novel ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction method and its application to the analysis of eleven polycyclic aromatic hydrocarbons at trace levels in water, *J Chromatogr A*, 1218, 2476-2482.

Du J., Yan H., She D., Liu B., Yang G. (2010) Simultaneous determination of cypermethrin and permethrin in pear juice by ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography, *Talanta*, 82(2), 698-703.

Du X., Li W., Zhang J., Li C., Ma J., Li J. (2010a) Ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction for determination of trace copper in water samples, *Huaxue Yanjiu Yu Yingyong*, 22(7), 965-968.

Du X., Liu W., Zhang J., Li C., Ma J., Li J. (2010b) Ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction combined with flame atomic absorption spectrometry for determination of trace zinc in water samples, *Hebei Nongye Daxue Xuebao*, 33(2), 123-127.

Ebrahimzadeh H., Saharkhiz Z., Tavassoli M., Kamarei F., Asgharinezhad A. A. (2011) Ultrasound-assisted emulsification microextraction based on solidification of floating organic droplet combined with HPLC-UV for the analysis of antidepressant drugs in biological samples, *J Sep Sci*, 34, 1275–1282.

Eisert R., Pawliszyn J. (1997) Design of automated solid-phase microextraction for trace analysis of organic compounds in aqueous samples, *J Chromatogr A*, 776, 293-303.

Fontana A. R., Altamirano J. C. (2010) Sensitive determination of 2,4,6-trichloroanisole in water samples by ultrasound assisted emulsification microextraction prior to gas chromatography–tandem mass spectrometry analysis *Talanta*, 81, 1536-1541.

Fontana A. R., Camargo A. B., Altamirano J. C. (2010a) Coacervative microextraction ultrasound-assisted back-extraction technique for determination of organophosphates pesticides in honey samples by gas chromatography–mass spectrometry, *J Chromatogr A*, 1217, 6334-6341.

Fontana A. R., Lana N. B., Martínez L. D., Altamirano J. C. (2010b) Ultrasound-assisted leaching-dispersive solid-phase extraction followed by liquid-liquid microextraction for the determination of polybrominated diphenyl ethers in sediment samples by gas chromatography-tandem mass spectrometry, *Talanta*, 82(1), 359-366.

Fontana A. R., Wuilloud R. G., Martínez L. D., Altamirano J. C. (2009) Simple approach based on ultrasound-assisted emulsification-microextraction for determination of polibrominated flame retardants in water samples by gas chromatography–mass spectrometry, *J Chromatogr A*, 1216, 147-153.

Gaikwad S. G., Pandit A. B. (2008) Ultrasound emulsification: effect of ultrasonic and physicochemical properties on dispersed phase volume and droplet size, *Ultrason Sonochem*, 15, 554–563.

Hoffmann M.K., Hua I., Hochemer R. (1996) Application of ultrasonic irradiation for the degradation of chemical contaminants in water, *Ultrason Sonochem*, 3, S163–S172.

Huang K. J., Jin C. X., Song S. L., Wei C. Y., Liu Y. M., Li J. (2011) Development of an ionic liquid-based ultrasonic-assisted liquid–liquid microextraction method for sensitive determination of biogenic amines: Application to the analysis of octopamine, tyramine and phenethylamine in beer samples, *J Chromatogr B*, 879, 579-584.

Huang K. J., Wei C. Y., Liu W. L., Xie W. Z., Zhang J. F., Wang W. (2009) Ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography-fluorescence

detection for sensitive determination of biogenic amines in rice wine samples, *J Chromatogr A*, 1216, 6636-6641.

Jofré V. P., Assof M. V., Fanzone M. L., Goicoechea H. C., Martínez L. D., Silva M. F. (2010) Optimization of ultrasound assisted-emulsification-dispersive liquid-liquid microextraction by experimental design methodologies for the determination of sulfur compounds in wines by gas chromatography-mass spectrometry, *Anal Chim Acta*, 683, 126-135.

Lauterborn W., Ohi C. D. (1997) Cavitation bubble dynamics, *Ultrason Sonochem*, 4, 65-75.

Li S. Q., Cai S., Hu W., Chen H., Liu H. (2009) Ionic liquid-based ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction combined with electrothermal atomic absorption spectrometry for a sensitive determination of cadmium in water samples, *Spectrochim Acta B*, 64 (7), 666-671.

Lin S. L., Fuh M. R. (2010) Orthogonal array optimization of ultrasound-assisted emulsification-microextraction for the determination of chlorinated phenoxyacetic acids in river water, *J Chromatogr A*, 1217, 3467-3472.

Lu, W., Sun F., Dong J., Shen Y. (2010) Determination of diafenthiuron residue in water by ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction-reversed phase liquid chromatography, *Fenxi Ceshi Xuebao*, 29(11), 1198-1202.

Luque de Castro M.D., Priego-Capote F. (2007a) Ultrasound assistance a liquid-liquid extraction: A debatable analytical tool, *Anal Chim Acta*, 583, 2-9.

Luque de Castro M.D., Priego-Capote F. (2007b) Ultrasound-assisted preparation of liquid samples, *Talanta*, 72, 321-334.

Ma J. J., Du X., Zhang J. W., Li J. C., Wang L. Z. (2009) Ultrasound-assisted emulsification-microextraction combined with flame atomic absorption spectrometry for determination of trace cadmium in water samples, *Talanta*, 80, 980-984.

Ma J., Zhang J., Du X., Lei X., Li J. (2010) Solidified floating organic drop microextraction for determination of trace amounts of zinc in water samples by flame atomic absorption spectrometry, *Microchim Acta*, 168(1-2), 153-159.

Mao T., Hao B., He J., Li W., Li S., Yu Z. (2009) Ultrasound assisted ionic liquid dispersive liquid phase extraction of lovastatin and simvastatin: A new pretreatment procedure, *J Sep Sci*, 32, 3029-3033.

Ozcan S., Tor A., Aydin M. E. (2009a) Determination of selected polychlorinated biphenyls in water samples by ultrasound-assisted emulsification-microextraction and gas chromatography-mass-selective detection, *Anal Chim Acta*, 647 (11), 182-188.

Ozcan S., Tor A., Aydin M. E. (2009b) Application of ultrasound-assisted emulsification-micro-extraction for the analysis of organochlorine pesticides in waters, *Water Res*, 43, 4269-4277.

Ozcan S., Tor A., Aydin M. E. (2010) Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in waters by ultrasound-assisted emulsification-microextraction and gas chromatography-mass spectrometry, *Anal Chim Acta*, 665, 193-199.

Pawliszyn J., (1997) Solid-Phase Microextraction: Theory and Practice, Wiley-VCH, New York.

Regueiro J., Llompарт M., Garcia-Jares C., Garcia-Monteaгudo J. C., Cela R. (2008) Ultrasound-assisted emulsification-microextraction of emergent contaminants and pesticides in environmental waters, *J Chromatogr A*, 1190, 27-38.

Regueiro J., Llompарт M., Psillakis E., Garcia-Monteaгudo J. C., Garcia-Jares C. (2009) Ultrasound-assisted emulsification-microextraction of phenolic preservatives in water, *Talanta*, 79, 1387-1397

Saleh A., Yamini Y., Faraji M., Rezaee M., Ghambarian M. (2009) Ultrasound-assisted emulsification microextraction method based on applying low density organic solvents followed by gas chromatography analysis for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples, *J Chromatogr A*, 1216, 6673-6679.

Su Y. S., Jen J.F. (2010) Determination of organophosphorous pesticides in water using in-syringe ultrasound-assisted emulsification and gas chromatography with electron-capture detection, *J Chromatogr A*, 1217, 5043-5049.

SUPELCO (2011) Fiber Selection Guide, <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/sample-preparation/spme/selecting-spme-fiber.html> (Consultado el 30 de noviembre de 2011).

Viñas P., Martínez-Castillo N., Campillo N., Hernández-Córdoba M. (2010) Liquid-liquid microextraction methods based on ultrasound-assisted emulsification and single-drop coupled to gas chromatography-mass spectrometry for determining strobilurin and oxazole fungicides in juices and fruits, *J Chromatogr A*, 1217, 6569-6577.

Wang Y., You J., Bao C., Zhang H., Yu A., Yu Y. (2010) Determination of triazines by ultrasonic-assisted ionic liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography, *Chinese J Chem*, 28(5), 785-790.

Wu C., Liu N., Wu Q., Wang C., Wang Z. (2010) Application of ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction for the determination of some organophosphorus pesticides in water samples, *Anal Chim Acta*, 679, 56-62.

Wu J., Xiang B., Xia J. (2009) Application of ultrasound-assisted emulsification-microextraction combined with high performance liquid chromatography to the determination of propoxur in environmental and beverage samples, *Microchim Acta*, 166(1-2), 157-162.

Wu Q. H., Li Z., Wu C. X., Wang C., Wang Z. (2010a) Application of ultrasound-assisted emulsification microextraction for the determination of triazine herbicides in soil samples by high-performance liquid chromatography, *Microchim Acta*, 170(1-2), 59-65.

Wu Q., Chang Q., Wu C., Rao H., Zeng X., Wang C., Wang Z. (2010b) Ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction for the determination of carbamate pesticides in water samples by high performance liquid chromatography, *J Chromatogr A*, 1217, 1773-1778.

Xu H., Liao Y., Yao J. (2007) Development of a novel ultrasound-assisted headspace liquid-phase microextraction and its application to the analysis of chlorophenols in real aqueous samples, *J Chromatogr A*, 1167, 1-8.

Yan H., Du J., Zhang X., Yang G. Row K. H., Lv Y. (2010a) Ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction coupled with capillary gas chromatography for simultaneous analysis of nine pyrethroids in domestic wastewaters, *J Sep Sci*, 33(12), 1829-1835.

Yan H., Liu B., Du J., Row K. H. (2010b) Simultaneous determination of four phthalate esters in bottled water using ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction followed by GC-FID detection, *Analyst*, 135(10), 2585-2590.

Yan H., Liu B., Du J., Yang G., Row K. H. (2010c) Ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of six pyrethroids in river water, *J Chromatogr A*, 1217, 5152-5157.

Zhou Q., Zhang X. (2010) Combination of ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid-phase microextraction and high performance liquid chromatography for the sensitive determination of benzoylureas pesticides in environmental water samples, *J Sep Sci*, 33(23-24), 3734-3740.

Zhou Q., Zhang X., Xiao J. (2009) Ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid-phase micro-extraction: A novel approach for the sensitive determination of aromatic amines in water samples, *J Chromatogr A*, 1216, 4361-4365.

III. Parte Experimental y Resultados

III. Parte Experimental y Resultados

1. Determinación de fármacos ácidos y compuestos potencialmente disruptores endocrinos en agua de abastecimiento y residual, por elución selectiva y determinación por GC-MS

1.1 Resumen e introducción

Las aguas residuales contienen muchos compuestos orgánicos, entre ellos, ingredientes activos de diversos fármacos, productos de uso personal y de limpieza en general, que se usan en grandes cantidades.

Generalmente, los principios activos de los fármacos son metabolizados. Sin embargo, una fracción significativa de la sustancia original no se metaboliza y se excreta a través de orina y heces, que son descargados en el agua residual. Además, algunos de los metabolitos excretados se pueden incluso transformar de nuevo en el principio activo original (Daughton y Ternes, 1999; Ternes, 2001).

A través de las descargas, los contaminantes se dispersan en el ambiente. Estas descargas continuas, aún a concentraciones del orden de los $\mu\text{g/L}$, presentan el riesgo de afectar a largo plazo los ecosistemas acuáticos. Diversos autores han descrito la presencia de estos contaminantes en aguas superficiales y subterráneas e incluso agua potable (Heberer, 2002a; Koplín *et al.*, 2002; Ternes, 1998).

Las alternativas analíticas para determinar compuestos emergentes, incluyen una gama de opciones que al combinarlas pueden suponer el beneficio de obtener resultados consistentes, reproducibles y minimizar

las interferencias del efecto matriz de muestras complejas (aguas residuales).

Ternes (Ternes, 2001) estudió el uso de cinco métodos para la determinación de fármacos y sus metabolitos en agua, a concentraciones del rango de los ng/L. Estos métodos incorporan la extracción en fase sólida (SPE), derivatización y detección por GC-MS y GC-MS/MS o LC-elecspray/MS/MS. La extracción en fase sólida (SPE) usando cartuchos Oasis HLB (copolimero de divinilbenceno/N-vinilpirrolidona) de Waters se ha aplicado a muestras de aguas residuales para la extracción de fármacos y otros contaminantes emergentes (Gómez, et al., 2007).

Los compuestos seleccionados entre los contaminantes emergentes, para este estudio son relativamente polares y no volátiles. El interés por el análisis de estos contaminantes es bastante reciente y se basa en el desarrollo de técnicas avanzadas como es el caso de la cromatografía de líquidos (LC) acoplada a detectores de espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Se ha incrementado la selectividad por medio de los detectores de masas tándem y una adecuada preparación de muestra, especialmente en el caso de matrices difíciles como las aguas residuales. Sin embargo, este tipo de instrumentación no se encuentra comúnmente en los laboratorios de química ambiental, por lo que se considera de gran interés el desarrollo de metodologías de análisis basadas en la utilización de técnicas más asequibles como la cromatografía de gases acoplada a detectores selectivos de masas. La preparación de muestras, y específicamente la limpieza de las mismas, es un reto ya que puede dar lugar a una disminución de la respuesta e incrementar el número de inyecciones rutinarias y de mantenimiento. La preparación de las muestras y la purificación de extractos puede ser complicada, e incrementa el tiempo y costo de los análisis.

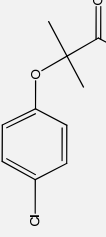
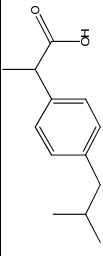
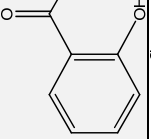
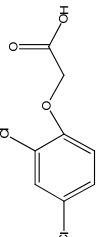
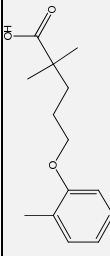
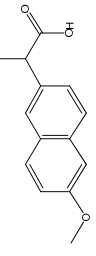
Por las razones expuestas se propone una metodología de análisis para la determinación de fármacos ácidos y compuestos potencialmente disruptores endocrinos en aguas de abastecimiento, usando un procedimiento de extracción simple basado en la extracción en fase sólida y su determinación por cromatografía de gases-espectrometría de masas.

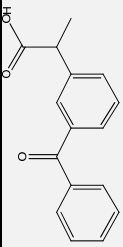
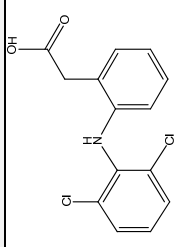

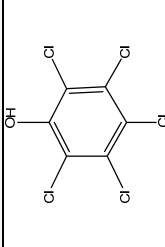
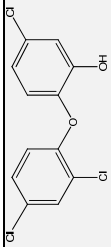
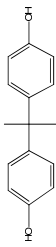
1.2 Parte experimental

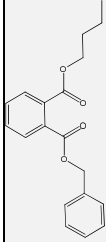
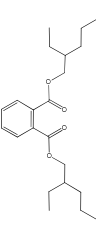
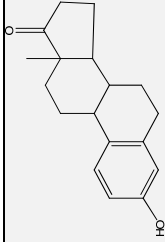
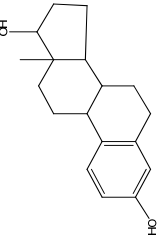
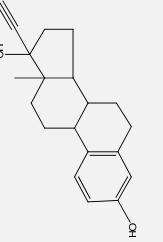
1.2.1 Reactivos y materiales

Los compuestos incluidos en este estudio (Tabla 1.1) así como los estándares de recuperación 4-*n*- nonilfenoles y el estándar interno [$^2\text{H}_{16}$] bisfenol A fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). El ácido 3,4-diclorofenoxiacético (3,4-D) y 2,3-diclorofenoxiacético (2,3-D) fueron adquiridos de Riedel-de Haën (Seelze, Alemania). Los estrógenos deuterados [$^2\text{H}_4$] estrona, [$^2\text{H}_4$]17 β -estradiol y [$^2\text{H}_4$]17 α -etinilestradiol fueron obtenidos de Cambridge Isotopes (Andover, MA, EUA). Los agentes derivatizantes *N-tert*-butildimetilsilil-*N*-metiltri-fluoroacetamida con 1% *tert*-butildimetilclorosilano (MTBSTFA) así como *N,O*- bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) con 1% de trimetilclorosilano (TMSCI) fueron adquiridos de Sigma – Aldrich. Todos los disolventes (agua, metanol, acetona, hexano y acetato de etilo) fueron grado HPLC suministrados por Burdick and Jackson (Morristown, NJ, EUA). Los cartuchos de extracción Oasis HLB fueron adquiridos de Waters (Milford, MA, EUA).

Tabla 1.1. Contaminantes emergentes y disruptores endocrinos considerados en el estudio.

Compuesto (No. CAS)	Uso	Formula	Peso molecular g/mol	Log K _{ow}
Ácido clofibrico	regulador de lípidos		214.65	2.84 (Henschel et al., 1997)
Ácido 2-(4-Clorofenoxi)-2-metilpropanoico 882-09-7	metabolito del clofibrato			
Ibuprofeno	analgésico y antiinflamatorio		206.29	3.97 (Avdeef et al., 1998)
ácido 2-[4-(2-metilpropi) fenil] propanoico 15687-27-1				
Ácido salicílico	metabolito del ácido acetilsalicílico		138.12	2.24 (Machatha y S. H. Yalkowsky, 2005)
Ácido 2-hidroxibenzoico 69-72-7				
2,4-D ácido (2,4- diclorofenoxiacético)	pesticida		221.04	2.81 (U.S. DHHS., 1993)
94-75-7				
Gemfibrozil	regulador de lípidos		250.33	6.72 (Hassan et al., 2004)
Ácido 5-(2,5-dimetilfenoxi)-2,2-dimetil-pentanoico 25812-30-0				
Naproxeno	analgésico y antiinflamatorio		230.26	3.06 (Liu et al., 2004)
Ácido (αS)-6-metoxi-α-metil-2-naftalenacético 22204-53-1				

Compuesto (No. CAS)	Uso	Formula	Peso molecular g/mol	Log K _{ow}
Ketoprofeno Ácido 2-(3-benzoilfenil) propanoico 22071-15-4	analgésico y antiinflamatorio		254.28	2.77 (Liu et al., 2004)
Diclofenaco ácido 2-(2-(2,6- diclorofenilamino)fenil) acético 15307-86-5	antiflogístico		296.14	4.51 (Avdeef et al., 1998)
4-nonilfenol p-nonilfenol 104-40-5	químico industrial, metabolito de los alquifenoles etoxilados (surfactantes)		220.351	4.6 (Fenjin et al., 2005)
Pentaclorofenol 2,3,4,5,6-Pentaclorofenol 87-86-5	pesticida		266.34	5.24 (Schellenberg et al., 1984)
Triclosan 5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi) fenol 3380-34-5	antiséptico		289.55	4.76 (MITI, 1992)
Bisfenol A 4,4'-dihidroxi-2,2-difenilpropano 80-05-7	químico industrial		228.28	3.4 (Institute for Health, 2003)

Compuesto (No. CAS)	Uso	Formula	Peso molecular g/mol	Log K _{ow}
Butilbencilftalato (BBP) n-butil bencil ftalato (BBP) 85-68-7	plastificante		312.36	4.77 (Ellington et Floyd., 1996)
Bis-2-etilhexilftalato (DEHP) 117-81-7	plastificante		390.56	7.54 (Ellington et Floyd., 1996)
Estrona3-hidroxi-13-metil- 6,7,8,9,11,12,13,14,15,16- decahidrociclopenta[aj]fenantreno- 17- ona 53-16-7	estrógeno natural		270.36	3.43 (Lai, et al., 2000)
17- β-estradiol (8R,9S,13S,14S,17S)-13-metil- 6,7,8,9,11,12,14,15,16,17- decahidro ciclopenta[aj]fenantreno-3,17-diol 50-28-2	estrógeno natural		272.39	3.94 (Lai, et al., 2000)
17- α-etinilestradiol 17-etinil-13-metil- 7,8,9,11,12,13,14,15,16,17- decahidro-6Hciclopenta[a] fenantreno- 3,17-diol 57-63-6	estrógeno sintético		296.41	3.9 (Holthaus, et al., 2002)

1.2.2 Muestreo

Agua Potable

De las fuentes de abastecimiento propias, el 47.29 % del caudal que consume el Distrito Federal (DF) se abastece por medio de 614 pozos profundos del Valle de México, aportando un gasto promedio anual de 15.5 m³/s; el aporte por medio de manantiales representa sólo el 2.42 % (0.796 m³/s). De fuentes externas hay un aporte de 16.51 m³/s que se traduce al 50.28 % del abastecimiento total para el DF. Por lo anterior, el DF se abastece en promedio diario de 32.833 m³/s para una población de poco más de 8.7 millones de habitantes (únicamente Distrito Federal), los cuales el 98 % tienen una cobertura vía red de distribución y el 2 % restante por cobertura vía camiones cisterna.

A partir de la información recabada se propuso muestrear en los puntos que se indican en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2. Sitios de muestreo en el Valle de México en 2008.

Sitio de muestreo	Fecha -2008
Planta potabilizadora "Los Berros"	20 de mayo
Tanques Dolores (se abastecen del Ramal Sur del Lerma)	17 de junio
Caída del Borracho (Acueducto Lerma)	24 de junio
Toma "0"	13 de mayo
Presa Guadalupe	13 de mayo
Tanque "La Caldera"	27 de mayo
Pozo Chalco	27 de mayo
Pozo 310	27 de mayo
Tanque Cerro Gordo: Batería, mezcla acuaférico	10 de junio
Los Reyes	
Cutzamala	
Mezcla	

Las muestras fueron preservadas con metanol (2%, v/v) y transportadas en neveras hasta el laboratorio donde se almacenaron en la cámara fría a 4 °C, hasta el día siguiente, en que se realizó la extracción. El muestreo se realiza en frascos de vidrio ámbar para evitar la fotodegradación de los compuestos.

Agua Residual

El agua residual municipal e industrial, así como el agua de lluvia de la ciudad de México se mezcla y desaloja por tres sistemas de drenaje que son el Emisor Central, el Interceptor Poniente y el Gran Canal. Todos coinciden al final en la zona de riego conocida como Valle de Tula en el estado de Hidalgo a 70 km de la ciudad de México. La velocidad de flujo promedio es de aproximadamente 50 m³/s y no recibe ningún tratamiento, por esto se le ha denominado agua residual cruda. Las muestras de agua residual para la validación del método se tomaron en el Emisor Central entre febrero y marzo de 2007 (época de estiaje) y entre junio y julio del mismo año (época de lluvia); durante el mismo periodo se tomaron las muestras del manantial “Cerro colorado” que tiene una antigüedad de aproximadamente 30 años. Las muestras también fueron preservadas con metanol (2%, v/v) y transportadas en neveras hasta el laboratorio donde se conservaron en la cámara fría a 4 °C, hasta el día siguiente que se realizó la extracción.

1.2.3 Preparación de las muestras y metodología de validación

Durante los trabajos iniciales se demostró que la extracción en fase sólida usando fase C-18 o fase Oasis HLB seguida por elución con acetona o metanol generaba un extracto donde un exceso de matriz

causaba interferencias en el análisis con GC-MS, ya que algunos compuestos de interés solapaban con otros compuestos orgánicos. Adicionalmente, se observó que algunos reactivos derivatizantes (sililantes) no eran compatibles para la derivatización simultánea de los ácidos y los otros analitos. Con esta información, se propuso el desarrollo de un método con separación de los ácidos del resto de los analitos. El método desarrollado se enfoca hacia la optimización de la separación de la fracción ácida, usando el disolvente apropiado para eluir los analitos remanentes y seleccionando el agente sililante y las condiciones para la derivatización.

En la Figura 1.1 se presenta un esquema del procedimiento general para el tratamiento de las muestras. Las diferentes etapas del proceso se describen a continuación.

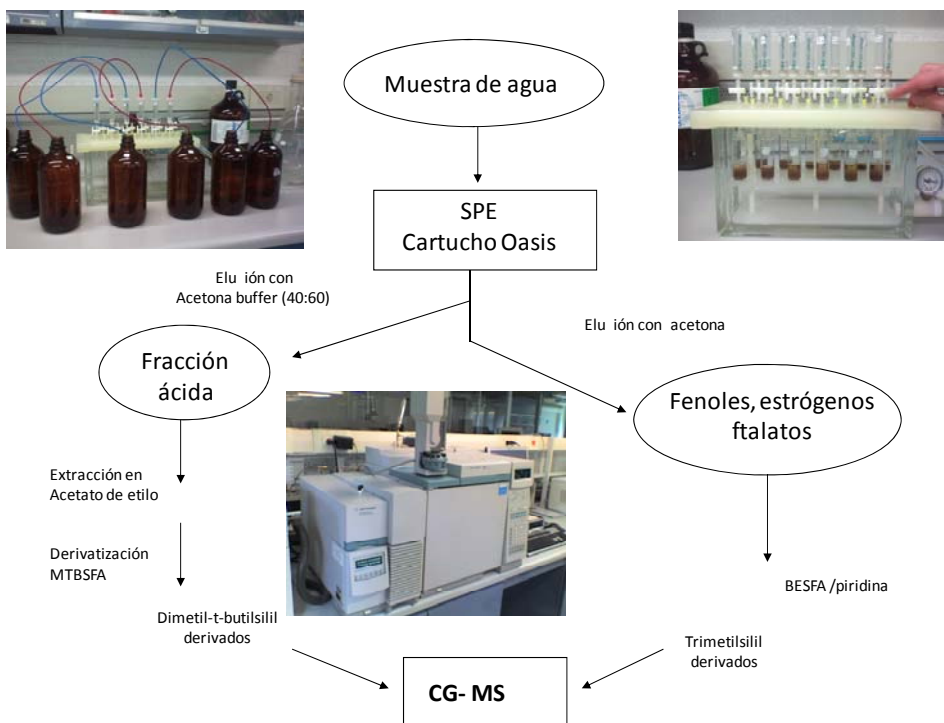


Figura 1.1. Representación esquemática del método analítico

1.2.4 Extracción

El agua de manantial y de pozo se extrajo sin filtrar de un volumen de 2000 mL y el agua residual (250 mL) se pre-filtró a través de un filtro de 1.2 μm de fibra de vidrio. Posteriormente las muestras fueron acidificadas a pH 2 con ácido sulfúrico (98%) y fortificadas con los compuestos de interés a las concentraciones que se indican a continuación: fortificación de aguas de manantial: 4-nonilfenoles, bisfenol-A, butibencilftalato (BBP) y bis-2-etilhexilftalato (DEHP): 25 ng/L (bajo) y 100 ng/L (alto); pentaclorofenol, triclosan y estrógenos: 5 ng/L (bajo) y 25 ng/L (alto); fortificación en aguas residuales: 4-nonilfenoles, bisfenol-A, butibencilftalato (BBP) y bis-2-etilhexilftalato (DEHP): 25 $\mu\text{g/L}$ y 50 $\mu\text{g/L}$ (alto); pentaclorofenol y triclosan: 10 $\mu\text{g/L}$ (bajo) y 25 $\mu\text{g/L}$ (alto); estrógenos: 100 ng/L (bajo) y 2000 ng/L (alto).

Finalmente se adicionaron los estándares de recuperación. En el caso de las aguas de manantial las cantidades fueron 100 ng de 4-*n*-nonilfenol, 100 ng de 3,4-D y 5 ng de [$^2\text{H}_4$] estrona; para aguas residuales 2000, 1000 y 20 ng respectivamente.

Para cada muestra se acondicionó un cartucho Oasis HLB (200 mg) con acetona (2x 5 mL) seguido por agua (5 mL). Las muestras (2000 mL de agua de abastecimiento y 250 mL de agua residual) se pasaron a través del cartucho a una velocidad de aproximadamente 10 mL/min usando vacío. Al término de la extracción, los cartuchos se lavaron con agua de grado HPLC (2 mL) y posteriormente se eluyeron con 5 mL de la disolución 40:60 de una mezcla acetona: buffer 0.10 M de bicarbonato de sodio (se ajustó el pH a 10 con una disolución 1.0 M de hidróxido de sodio). Esta fracción contiene los compuestos ácidos. Los cartuchos se lavaron con 2 mL de agua grado HPLC y se secaron bajo corriente de

vacío por una hora. Finalmente se realizó la elución con 5 mL de acetona. Esta fracción contiene los disruptores endocrinos potenciales.

1.2.5 Procedimiento de derivatización

La fracción ácida se evapora por 15 minutos bajo corriente de nitrógeno para eliminar una porción de la acetona presente, se acidifica a pH de 2 con ácido sulfúrico y se extraen los ácidos en acetato de etilo (2x 2 mL). Los remanentes de agua se eliminan con sulfato de sodio anhidro. Se adiciona el 2,3-D como estándar interno (100 ng para agua de manantial y 1000 ng para aguas residuales). La muestra se evapora a sequedad bajo corriente de nitrógeno a temperatura ambiente. Los residuos son reconstituidos en acetato de etilo y se adiciona MTBSTFA; los volúmenes fueron 25 y 25 μL , respectivamente, para agua de manantial o pozo, y 25 y 50 μL , respectivamente, para aguas residuales. Los derivados N-tert-butildimetilsilil se generaron por reacción a 60 °C durante 30 minutos. Los extractos de agua de manantial fueron inyectados directamente en el cromatógrafo y los de agua residual se diluyeron a 1000 μL con acetato de etilo.

La fracción en acetona, que contiene los demás analitos, se evaporó hasta aproximadamente 200 μL y se adicionó 1 mL de acetato de etilo. El agua remanente se eliminó adicionando sulfato de sodio anhidro. Posteriormente se adicionaron los estándares internos: [$^2\text{H}_{16}$] bisfenol A (100 ng para agua de manantial, 2000 ng para agua residual), [$^2\text{H}_4$]17 β -estradiol (5 y 20 ng, respectivamente, y [$^2\text{H}_4$]17 α -etinilestradiol (5 y 10 ng, respectivamente). La muestra se evaporó a sequedad bajo corriente de nitrógeno a temperatura ambiente. Se adicionó piridina y BSTFA, 15 y 35 μL , respectivamente, para agua de manantial, y 25 y 50 μL para

aguas residuales. Los derivados trimetilsilil se formaron por reacción a 60 °C durante 30 minutos. Los extractos de agua de manantial se inyectaron directamente, y los de aguas residuales se diluyeron a 1000 µL con acetato de etilo.

1.2.6 Análisis mediante cromatografía de gases con espectrometría de masas

En la tabla 1.3 se resumen las condiciones de trabajo instrumentales para la determinación de los compuestos considerados en este trabajo.

Tabla 1.3. Condiciones instrumentales GC-MS empleadas para la determinación de los compuestos

Cromatógrafo de gases Agilent 6890N	
Inyector	
Temperatura inicial	250 °C
Modo de inyección	splitless
Volumen de inyección	1 µL
Columna	
Fase estacionaria	(5% fenil, 95% dimetil)polisiloxano
Dimensiones	30 m × 0.25 mm x 0.25 µm
Programa de temperaturas	
Temperatura inicial	100 °C (1 min)
Rampa de temperatura	20 °C min ⁻¹ hasta 280 °C (10 min)
Tiempo total de análisis	20 min
Gas portador	He
Flujo en columna	1.0 mL min ⁻¹ (constante)
Detector selectivo de masas, Agilent 5973N	
Ionización MS	
Modo de ionización	Impacto electrónico (EI, +70 eV)
Modo de adquisición	ión selectivo (SIM)
Temperatura interfase	280 °C
Temperatura cuadrupolo	150 °C
Temperatura fuente de iones	230 °C

Los iones de cuantificación y confirmación monitorizados se detallan en las Tablas 1.4 y 1.5, y en las figuras 1.2 y 1.3 se muestran los cromatogramas de los estándares de los analitos. Los diferentes compuestos analizados se han dividido en compuestos ácidos y compuestos potencialmente disruptores endocrinos.

Tabla 1.4. Iones característicos y tiempos de retención de los ácidos, usando las condiciones de GC-MS descritas.

Analito	Tiempo de retención (min)	Iones característicos (m/z)
ácido clofibrico	7.78	271, 243, 143
ibuprofeno	7.97	263 , 264
ácido salicílico	8.55	310, 309 , 195
2,4-D	8.64	219, 277 , 279
gemfibrozil	9.6	307, 243 , 179
naproxeno	10.22	344, 287 , 185
ketoprofeno	10.9	312, 311 , 295
diclofenaco	11.52	354, 352 , 214
3,4- D	8.77	251, 277 , 279
2,3 - D	8.88	219, 277 , 279

Tabla 1.5. Iones característicos y tiempos de retención de los disruptores endocrinos potenciales, usando las condiciones de GC –MS descritas.

Analito	Tiempo de retención (min)	Iones característicos (m/z)
4-nonilfenoles	7.30→7.70	221 , 207, 193
pentaclorofenol	8.17	338, 325, 323
triclosan	9.43	362, 360, 200
bisfenol-A	9.75	372, 357
butibencilftalato (BBP)	9.6	91, 149 , 206
bis-2-etilhexilftalato (DEHP)	10.22	149 , 167, 279
estrone	12.17	342 , 257, 218

Analito	Tiempo de retención (min)	Iones característicos (m/z)
17β-estradiol	12.45	416 , 285
17α-etinilestradiol (EE2)	13.45	440, 425 , 285
4- <i>n</i> -nonilfenol	8.3	179 , 292
[² H ₁₆] bisfenol A	9.72	386 , 368, 217
[² H ₄] estrona	12.15	261, 346
[² H ₄]17β-estradiol	12.43	420
[² H ₄]17α-etinilestradiol	13.44	429 , 444

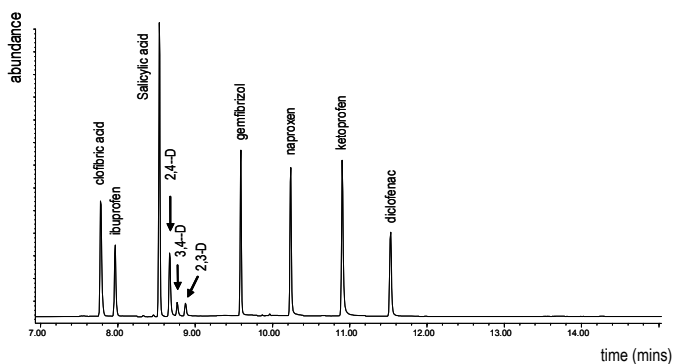


Figura 1.2. Cromatograma de estándares para la fracción ácida

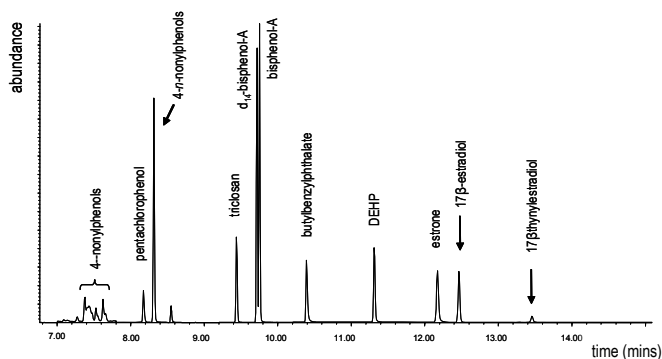


Figura 1.3. Cromatograma de estándares para los compuestos potencialmente disruptores endocrinos.

1.3 Resultados y discusión

1.3.1 Optimización del procedimiento de preparación de muestras

Los cartuchos Oasis HLB son adsorbentes de uso general para el aislamiento de un amplio rango de compuestos orgánicos en muestras acuosas. El ajuste a pH 2 con ácido sulfúrico asegura que los ácidos se encuentran protonados para una eficiente adsorción. Muchos métodos de extracción de compuestos orgánicos que usan este tipo de adsorbentes no incluyen un paso para la elución de interferencias ni plantean la elución separada de las diferentes clases de analitos. Estos procedimientos tienen la ventaja de su simplicidad, pero la desventaja de la presencia de impurezas de la matriz que se inyectarán en el cromatógrafo. Esto puede resultar en la presencia de picos interferentes en los cromatogramas, un deterioro constante en la forma de los picos causado por la contaminación del sistema inyector o de la columna, o en una rápida reducción en la sensibilidad debida a contaminación de la fuente del detector.

Algunas de las muestras estudiadas procedentes de aguas residuales crudas presentaron altas concentraciones de materia orgánica. Una extracción simple usando cartuchos Oasis HLB con elución en acetona y análisis por cromatografía de gases – espectrometría de masas produjo unos cromatogramas difíciles de interpretar debido al exceso de interferencias. En casos como éste, es necesario realizar un paso de limpieza extra. En este trabajo se decidió manipular las muestras en el propio cartucho con la consecuente reducción de tiempo, costo y uso de disolvente. Los ácidos orgánicos se eluyeron primero usando un mezcla de un buffer de 0.10 M de bicarbonato de sodio y acetona (60:40). La conversión de los ácidos a su forma iónica con buffer de pH 10 no fue

suficiente para completar la desorción. En ensayos preliminares se demostró que el metanol no fue adecuado para realizar la elución, ya que eluye sólo parcialmente algunos ácidos. Sin embargo, con acetona al 40 % se recuperan todos los ácidos, sin el riesgo de eluir los otros analitos. Esta fracción ácida eluye la mayor parte de la materia orgánica (estimada por la respuesta en modo full scan en GC–MS), mucha de la cual se elimina posteriormente mediante la etapa de extracción en acetato de etilo.

La elución ácida actúa como una limpieza efectiva para los disruptores endocrinos que son remanentes en el cartucho. Esto se demostró por una comparación en modo full scan (50-500 m/z) donde la fracción de acetona fue mucho más limpia después de la elución previa con la mezcla buffer – acetona (Figura 1.4).

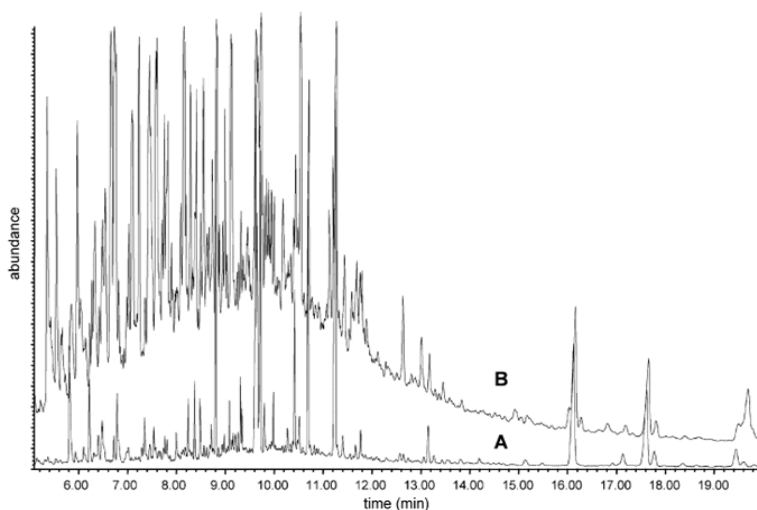


Figura 1.4. Comparación de cromatogramas (modo full scan). A: Elución con buffer–acetona; B: Elución sin buffer–acetona.

Los experimentos con estándares mostraron que era posible eluir los disruptores endocrinos tanto con acetato de etilo como con acetona obteniendo una muestra final limpia. Sin embargo, el metanol, es un disolvente comúnmente usado para eluir esta clase de compuestos de estos cartuchos.

Finalmente, la acetona se seleccionó como disolvente de elución porque en presencia de los compuestos de la matriz de aguas residuales crudas se presentaron recuperaciones de menos del 50% de bisfenol A y 4-nonilfenoles en acetato de etilo. Esto demuestra que el comportamiento de los compuestos retenidos en los cartuchos de extracción en fase sólida (o en otros materiales cromatográficos) puede verse afectado profundamente por la presencia de material de la matriz, por lo que, concretamente en matrices ambientales, se deben desarrollar las metodologías con muestras reales y no únicamente con estándares. Estas diferencias podrían explicar las bajas recuperaciones de 4-nonilfenoles reportadas recientemente en diversas muestras de agua (Gatidou et al., 2007).

Se han descrito estudios previos de optimización de las cantidades de reactivos a utilizar para diferentes derivatizaciones (Rodríguez et al., 2003), aunque en general, no se considera el efecto de los volúmenes sobre los límites de detección. En el presente trabajo, debido al interés por generar la menor cantidad de residuos, se investigó la utilización de volúmenes reducidos de disolvente y de agentes derivatizantes (10-100 μ L) con el objetivo de encontrar límites de detección relevantes para concentraciones ambientales, particularmente para aguas de manantiales y de pozos. Los resultados obtenidos fueron consistentes con los volúmenes finales seleccionados y por tanto, esta opción de

reducción de volúmenes fue seleccionada en lugar de la opción de evaporar parcialmente el disolvente, lo cual podía originar pérdidas por volatilización.

Los derivados producidos por reacción de los fármacos ácidos con MTBSTFA producen mejores picos y mejoran la sensibilidad en comparación con la derivatización con BSTFA. Ambos métodos de derivatización fueron generalmente eficientes para los fenoles y estrona, pero los derivados trimetilsilil de 17β -estradiol y de 17α -etinilestradiol (EE2) presentaron mayor sensibilidad que los obtenidos con N-*tert*-butildimetilsilil. Adicionalmente, existen evidencias de que el EE2 se convierte parcialmente a estrona durante la derivatización con MTBSTFA (Yu et al., 2007).

Por tanto, la separación de fracciones no sólo produce un extracto más limpio de los disruptores endocrinos, sino que también permite flexibilidad en el uso de diferentes procedimientos de derivatización para optimizar la respuesta en el sistema GC-MS.

1.3.2 Estudio de la linealidad y estimación de los límites de detección

La linealidad instrumental fue aceptable para todos los analitos, con coeficientes de correlación mayores de 0.992 en el rango de concentración estudiado, tal y como se observa en la Tabla 1.6 donde también se incluyen los límites de detección.

Tabla 1.6. Linealidad instrumental (R^2) y límites de detección instrumentales (ng inyectados), en agua de manantial (ng/L) y en agua residual (ng/L).

Analito	R^2	LOD		
		INS	AM	AR
Ácido clofibrico	0.998	0.01	0.5	100
Ibuprofeno	0.993	0.001	0.25	50
Ácido salicílico	0.999	0.005	0.25	5
2,4-D	0.994	0.01	0.5	100
Gemfibrozil	0.998	0.01	0.5	50
Naproxeno	0.993	0.005	0.25	50
Ketoprofeno	0.997	0.01	0.25	50
Diclofenaco	0.995	0.01	1	50
4-Nonilfenoles	0.996	0.025	1	50
Pentaclorofenol	0.994	0.01	0.2	20
Triclosan	0.996	0.01	0.1	10
Bisfenol-A	0.996	0.01	0.5	20
Butibencilftalato (BBP)	0.996	0.01	0.5	50
Bis-2-etilhexilftalato (DEHP)	0.997	0.01	0.5	50
Estrona	0.999	0.001	0.005	1
17 β -Estradiol	0.999	0.001	0.005	0.5
17 α -Etinilestradiol (EE2)	0.999	0.002	0.05	2.5

INS: instrumento; AM: agua de manantial; AR: agua residual

Los límites de detección (LOD) del método se estimaron como tres veces la señal de la línea base (relación señal-ruido de tres). Los límites de detección para los ácidos en agua de manantial fueron entre 0.25 y 1.0 ng/L, de 0.1 a 1.0 ng/L para los fenoles, 0.5 ng/L para los ftalatos y entre 0.005 y 0.05 ng/L para los estrógenos (ver Tabla 1.6). Estas aguas no contienen grandes cantidades de compuestos orgánicos y los límites para fenoles, ftalatos y, particularmente, los estrógenos se determinaron más por la sensibilidad de la instrumentación analítica y el volumen de muestra tomado, y menos por los compuestos contenidos

en la matriz. La fracción ácida fue menos limpia y los límites se dictaminaron parcialmente por la respuesta de la matriz en las muestras. En el caso de las muestras de aguas residuales crudas los límites de detección para los ácidos variaron entre 5 y 100 ng/L, para los fenoles entre 10 y 50 ng/L, para los ftalatos fue 50 ng/L y varió entre 0.5 y 2.5 ng/L para los estrógenos. Los límites, en este caso, están condicionados por las pequeñas cantidades de muestra de agua procesada (250 mL) y el fondo generado por la materia orgánica.

En general, los límites de detección obtenidos son comparables con los valores reportados en la literatura en aguas subterráneas, superficiales y residuales (ANEXO). La elución simple con buffer-acetona es la clave para lograr la limpieza de la fracción que contiene los disruptores endocrinos y poder usar la cromatografía de gases–espectrometría de masas para el análisis de muestras complejas como las aguas residuales crudas obteniendo límites de detección relevantes desde el punto de vista ambiental. Por ejemplo, los límites de detección para los estrógenos en aguas residuales crudas fueron inferiores en este estudio a los reportados para aguas superficiales (Yu, et al., 2007), menores que los reportados en un método para aguas residuales tratadas que adicionalmente usan una columna de limpieza (Ingrand, 2003), y comparables a los reportados usando cromatografía de gases acoplado a un detector de masas – en tándem para el análisis final (Carballa et al., 2004).

1.3.3 Datos de recuperación

El método se validó usando tipos representativos de aguas de manantial y aguas residuales crudas (sin tratamiento). Las muestras se fortificaron con los analitos de interés al menos a dos concentraciones; la inferior fue seleccionada teniendo en cuenta concentraciones ambientales realistas.

La fortificación de los ácidos se realizó a 10, 25 y 100 ng/L en aguas de manantial, y a 10, 25 y 50 µg/L en aguas residuales. Los disruptores endocrinos fueron fortificados a dos concentraciones en cada tipo de agua, dependiendo de las concentraciones esperadas en cada fuente (ver parte experimental).

Los valores de las recuperaciones de los compuestos ácidos se detallan en la Tabla 1.7.

Tabla 1.7. Datos de recuperación (%±RSD para compuestos ácidos (n=3))

Analito	Fortificación agua de manantial (ng/L)			Fortificación agua residual (µg/L)		
	(5)	(25)	(100)	(10)	(25)	(50)
Ácido clofibrico	82±5	92±6	92±8	68±2	70±2	77±2
Ibuprofeno	96±3	97±5	88±8	76±4	78±3	85±2
Ácido salicílico	293±39	139±47	107±63	114±9	90±8	113±4
2,4-D	91±5	96±6	88±7	81±4	78±3	81±3
Gemfibrozil	82±4	91±3	87±6	82±3	77±2	83±2
Naproxeno	90±16	90±8	83±4	74±7	73±3	81±3
Ketoprofeno	78±2	96±9	86±3	80±3	76±2	80±2
Diclofenaco	76±4	87±8	81±2	84±4	80±3	94±2

Los promedios de recuperación (excluyendo el ácido salicílico) en agua de manantial estuvieron entre 76 y 96 % para la fortificación de 5 ng/L, de entre 87 y 97 % a 25 ng/L y de 81 a 92 % para 100 ng/L; las

desviaciones estándar relativas fueron generalmente inferiores al 10 %. Las recuperaciones en el caso de las aguas residuales variaron de 68 a 114 % para la fortificación de 10 µg/L, de 70 a 90 % para el nivel intermedio (25 µg/L) y de entre 77 a 113% para la fortificación de 50 µg/L; las desviaciones estándar relativas fueron menores al 10 %. Las recuperaciones y precisión del método se consideran satisfactorias excepto para el ácido salicílico en agua de manantial atribuido a una variación natural en las concentraciones de este ácido ocasionando una concentración alta y variable. El ácido 2,3-D demostró ser un estándar interno óptimo para todos los ácidos.

Para el caso de los disruptores endocrinos potenciales se usaron distintas concentraciones de fortificación considerando las concentraciones reportadas en los diferentes tipos de agua (Tabla 1.8).

Tabla 1.8. Datos de recuperación (% ± RSD) para compuestos disruptores endocrinos ($n=3$).

Analito	Fortificación en agua de manantial ^a		Fortificación en agua residual ^b	
	bajo	alto	bajo	alto
4-Nonilfenoles	109±18	108±15	81±12	75±10
Pentaclorofenol	94±8	101±11	32±5	27±16
Triclosan	93±11	100±6	95±11	85±19
Bisfenol-A	105±9	97±8	90±4	68±5
Butibencilftalato (BBP)	108±13	108±12	81±6	77±14
Bis-2-etilhexilftalato (DEHP)	104±1	75±21	-	124±6
Estrona	90±20	102±8	78±10	72±5
17β-Estradiol	89±9	99±10	107±7	94±5
17α-Etinilestradiol (EE2)	78±9	82±4	77±13	82±19

^a Fortificación de aguas de manantial: 4-nonilfenoles, bisfenol-A, butibencilftalato (BBP) y bis-2-etilhexilftalato (DEHP): 25 ng/L (bajo) y 100 ng/L (alto); pentaclorofenol, triclosan y estrógenos: 5 ng/L (bajo) y 25 ng/L (alto).

^b Fortificación en aguas residuales: 4-nonilfenoles, bisfenol-A, butibencilftalato (BBP) y bis-2-etilhexilftalato (DEHP): 25 µg/L (bajo) y 50 µg/L (alto); pentaclorofenol y triclosan: 10 µg/L (bajo) y 25 µg/L (alto); estrógenos: 100 ng/L (bajo) y 2000 ng/L (alto).

Las recuperaciones para el caso de las aguas de manantial estuvieron entre 78 y 109 % para las fortificaciones bajas y entre 82 y 108 % para las fortificaciones altas. Para las aguas residuales las recuperaciones variaron entre 77 y 107 % para los niveles bajos y entre 68 y 94 % para niveles altos con dos excepciones. La concentración ambiental de bis-dietilhexilftalato (DEHP) en aguas residuales fue considerablemente superior que la concentración alta de fortificación (entre 7 y 14 veces) por lo que no fue posible calcular la recuperación para la fortificación baja (25 µg/L), y en el caso de la fortificación alta (50 µg/L) los datos son poco fiables. Sin embargo, no se presentó bis-dietilhexilftalato en la fracción ácida y las recuperaciones para el butilbencilftalato (BBP) fueron aceptables.

Esto es consistente con los resultados obtenidos para el agua residual, lo cual sugiere que el método es aplicable para la determinación de bis-dietilhexilftalato (DEHP). Las recuperaciones de pentaclorofenol fueron consistentes y oscilaron alrededor del 30%. En varias fracciones ácidas se analizó el pentaclorofenol encontrando en promedio un 65% de recuperación, esto puede explicar las bajas recuperaciones obtenidas en la fracción de los disruptores endocrinos. Esta evidencia sugiere que el pentaclorofenol fue parcialmente adsorbido en la matriz de agua residual y que, por tanto, fue eluido parcialmente con la fracción ácida. En este caso sería posible obtener datos de recuperación a partir de las dos fracciones, pero esto se consideró muy poco práctico, por lo que se concluye que el método no es aplicable para determinar pentaclorofenol en aguas residuales. Esta es una evidencia significativa de las diferencias que pueden ocurrir entre el desarrollo de métodos con estándares y muestras reales, tal y como se apuntaba anteriormente.

En experimentos realizados sobre la fracción de los disruptores endocrinos, se demostró que existen algunas diferencias en la derivatización de los compuestos dependiendo de la presencia o ausencia de matriz. Aunque estas diferencias no fueron grandes y los dos estándares internos usados se consideran adecuados, al comparar los resultados obtenidos con las dos fracciones (ácidos y disruptores endocrinos) se tuvo mayor variabilidad en los resultados y en las desviaciones estándares relativas que, aunque fueron satisfactorias, son ligeramente mayores que para el caso de los ácidos.

El 3,4-D, 4-*n*-nonilfenol y [²H₄] estrona fueron propuestos como estándares de recuperación (ver parte experimental) para adicionarse a todas las muestras en análisis rutinarios, y también fueron adicionados a las muestras de validación y se determinó su recuperación (Tabla 1.9).

Tabla 1.9. Datos de recuperación (% ±RSD) para los estándares de recuperación.

Muestra	3,4-D	4- <i>n</i> -Nonilfenol	[² H ₄] estrona
Agua de manantial			
% de recuperación	111	96	104
RSD (%)	13	12	17
n	15	15	15
Aguas residuales			
% de recuperación	89	95	94
RSD (%)	5	10	17
n	15	15	15

En el caso del 3,4-D, estándar de recuperación para ácidos, la recuperación media fue de 111% para aguas de manantial y de 89 % para aguas residuales. En el caso de 4-*n*-nonilfenol fue de 96 % y 95% respectivamente, y para [²H₄] estrona fueron de 104 % y 94 % respectivamente. Aunque las recuperaciones fueron ligeramente superiores a las de la mayoría de los analitos, se concluye que estos compuestos son adecuados como estándares de recuperación para el procedimiento.

1.3.4 Concentraciones de analitos en blancos, aguas de manantial y aguas residuales

Se analizaron blancos en cada lote de muestras para monitorizar la posibilidad de contaminación. El acondicionamiento inicial de los cartuchos con acetona fue importante para eliminar la contaminación en general y en particular la de los 4-nonilfenoles. En el caso de los ácidos, el naproxeno y el ácido salicílico estuvieron consistentemente presentes en concentraciones mayores al límite de detección (Tabla 1.10). La contaminación en los blancos con 4-nonilfenoles y ftalatos, ligada a los disolventes y el material de los cartuchos, presente en el caso de las muestras de agua de manantial pero despreciable en el caso del agua residual, fue considerada y sustraída durante el cálculo de todos los resultados.

Como parte del procedimiento de validación, las concentraciones de los analitos fueron medidas en dos ocasiones en aguas de manantial y aguas residuales (Tabla 1.10). Todos los ácidos, excepto el ácido clofibrico, fueron detectados en las aguas residuales. Las concentraciones encontradas fueron similares a las reportadas para

influentes de plantas depuradoras pero superiores a las reportadas para los efluentes de dichas plantas (Verenitch 2006; Lee et al., 2005). Los valores de naproxeno, un fármaco de amplio consumo en México, fueron superiores a los datos que se han reportado para este fármaco, y los datos de ácido salicílico fueron muy variables. Los 4-nonifenoles (22.4 y 11.0 µg/L) y DEHP (702 y 356 µg/L) fueron los disruptores endocrinos predominantes en el agua residual cruda. Las concentraciones de triclosan, bisfenol-A y butilbencilftalato variaron entre 0.66 y 2.50 µg/L y las concentraciones de estrona y 17β-estradiol fueron de entre 80 y 44 ng/L y 22 y 17 ng/L respectivamente. Estos valores coinciden con los valores encontrados en la bibliografía (Lee et al., 2005; Johnson et al., 2005).

Se observa que las concentraciones de compuestos disruptores endocrinos potenciales en el segundo muestreo de aguas residuales fue aproximadamente el doble que durante el primer muestreo. Esto sugiere que se produjo un efecto de dilución durante la época de lluvias en la ciudad de México, aunque la concentración de los ácidos es semejante en ambos muestreos, excepto para el diclofenaco, lo que sugiere alguna otra influencia.

El ibuprofeno, naproxeno, ácido salicílico, triclosan, bisfenol A y ambos ftalatos se detectaron en agua de manantial pero a concentraciones varios órdenes de magnitud inferiores que en el agua residual cruda, lo que indica que se produce un proceso eficiente de eliminación al pasar por el suelo. La estrona (0.17 y 0.16 ng/L) y 17β-estradiol (0.02 y 0.01 ng/L) estuvieron también presentes aunque a concentraciones muy inferiores respecto al agua residual cruda.

Tabla 1.10. Concentración de fármacos ácidos y disruptores endocrinos potenciales en blancos, agua de manantial y aguas residuales.

Analito	Blancos* (ng/L)	Agua residual (µg/L)		Manantial (ng/L)	
		Muestreo1	Muestreo 2	Muestreo1	Muestreo 2
Ácido clofibrico	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Ibuprofeno	<LOD	4.38 (±0.62)	5.09 (±1.20)	2.2 (±1.2)	0.8 (±0.3)
Ácido salicílico	2.4	0.62 (±0.14)	29.06 (±25.18)	7.8 (±2.1)	9.6 (±12.2)
2,4-D	<LOD	0.37 (±0.03)	<LOD	<LOD	<LOD
Gemfibrozil	<LOD	0.68 (±0.13)	0.64 (±0.08)	<LOD	<LOD
Naproxeno	0.40	15.22 (±1.76)	16.65 (±3.48)	0.8 (±0.2)	0.90 (±0.03)
Ketoprofeno	<LOD	0.48 (±0.14)	0.26 (±0.07)	<LOD	<LOD
Diclofenaco	<LOD	1.72 (±0.38)	6.36 (±0.38)	<LOD	<LOD
4-Nonilfenoles	3.7	22.4 (±3.3)	11.0 (±1.1)	8 (±2)	1.8 (±2.3)
Pentaclorofenol	<LOD	-	-	<LOD	<LOD
Triclosan	0.13	2.04 (±0.29)	0.66 (±0.04)	1.3 (±0.2)	1.12 (±0.16)
Bisfenol-A	0.20	2.50 (±0.36)	0.77 (±0.05)	0.40 (±0.17)	0.41 (±0.21)
BBP	0.60	1.24 (±0.14)	0.71 (±0.05)	2.0 (±1.2)	1.7 (±0.4)
DEHP	14.5	702 (±49)	356 (±55)	25 (±3)	6.6 (±3.6)
Estrona	0.005	0.080 (±0.013)	0.044 (±0.001)	0.17 (±0.02)	0.16 (±0.02)
17β-Estradiol	0.002	0.022 (±0.004)	0.018 (±0.003)	0.020 (±0.003)	0.010 (±0.003)
EE2	<LOD	<LOD	<LOD	0.06 (±0.02)	<LOD

* Los valores de LOD para los blancos están basados en los datos para el agua de manantial.

Se han encontrado concentraciones trazas de muchos contaminantes emergentes en aguas subterráneas (Heberer, 2002), provocados por el riego con aguas residuales, con el consecuente riesgo de contaminación de los acuíferos (Ternes et al., 2007; Rabiet et al., 2006).

Una vez comprobada la validez del procedimiento propuesto para la determinación de contaminantes emergentes en aguas de manantial y residuales, adicionalmente se aplicó la técnica analítica validada, para determinar los analitos en las fuentes de abastecimiento tanto internas

como externas de agua potable de la ciudad de México. Los resultados obtenidos se presentan en las tablas 1.11 y 1.12.

Se observa que en todos los casos se detectan ácido salicílico e ibuprofeno, excepto en el efluente de la planta potabilizadora de los Berros y en la Toma "0" de la Comisión de Aguas del Estado de México.

La concentración de fármacos en la presa Guadalupe es considerable y principalmente en el caso de naproxeno (183 ng/L); esto puede indicar la posibilidad de contaminación por descargas de aguas residuales.

En el caso de los disruptores endocrinos se observa que en todos los casos se presentan nonilfenoles, bisfenol A y ftalatos en rangos que van desde 462 ng/L para los nonilfenoles en la presa Guadalupe y únicamente 9.3 ng/L para la muestra de la "Caída del Borracho".

En el proyecto de evaluación de la calidad del agua de abastecimiento a la ciudad de México se reporta preliminarmente la presencia de microorganismos coliformes fecales en algunos puntos como la presa Guadalupe así como parámetros físico-químicos como sulfatos y manganeso que hacen suponer que estas fuentes no son aptas para el consumo humano.

Tabla 1.11. Concentración de fármacos ácidos en agua de abastecimiento de la ciudad de México (ng/L) (n=3).

Sitio	Ácido clofibrico	Ibuprofeno	Ácido salicílico	2,4-D	Gemfibrozil	Naproxeno	Ketoprofeno	Diclofenaco
Influyente "Berros"	<LOD	<LOQ	6.7	37.4	<LOD	5.22	<LOQ	3.21
Efluente "Berros"	<LOD	<LOD	19.7	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Toma "0"	<LOD	<LOD	30	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Presa Guadalupe	<LOD	15.4	48.5	<LOD	9.84	183	<LOD	28.5
Pozo Chalco	<LOD	<LOD	3.4	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
La Caldera	<LOD	<LOQ	19.1	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Pozo 310	<LOD	<LOQ	8.3	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Cerro Gordo Los Reyes	1.9	2.70	1.7	<LOD	<LOQ	<LOD	0.88	<LOD
Cerro Gordo Cutzamala	<LOD	<LOD	18.1	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Cerro Gordo mezcla	<LOD	<LOD	14.5	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Dolores	<LOD	1.1	4.4	9.97	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOD
Caída Borracho	<LOD	1.3	21	9.97	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOD

Tabla 1.12. Concentración de disruptores endocrinos potenciales en agua de abastecimiento de la ciudad de México (ng/L) (n=3).

Sitio	NPs	Pentaclorofenol	Triclosan	Bisfenol-A	BBP	DEHP	Estrona	Estradiol	EE2
Influyente Planta Berros	94.3	<LOD	2.2	3.6	6.2	199	0.75	<LOD	<LOD
Efluente Planta Berros	71	<LOD	<LOQ	<LOD	2.5	227	<LOD	<LOD	<LOD
Toma O	57	<LOD	0.6	<LOD	2.9	317	<LOD	<LOD	<LOD
presa Guadalupe	200	<LOD	17.1	7.1	5.4	290.5	<LOD	6.3	<LOD
Pozo Chalco	15.5	<LOD	0.5	3.6	<LOQ	101.6	<LOD	<LOD	<LOD
La Caldera	17.5	<LOD	0.6	<LOD	2	98.4	<LOD	<LOD	<LOD
Pozo 310	42.3	<LOD	0.4	<LOD	<LOQ	101	<LOD	<LOD	<LOD
Cerro Gordo Los Reyes	36.6	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD	108.1	<LOD	<LOD	<LOD
Cerro Gordo Cutzamala	10.6	<LOD	0.5	<LOD	14.9	96.8	<LOD	<LOD	<LOD
Cerro Gordo mezcla	10.1	<LOD	<LOD	<LOD	14.1	104.8	<LOD	<LOD	<LOD
Dolores	12.5	<LOD	0.4	2.2	<LOD	148.7	<LOD	<LOD	<LOD
Caída Borracho	9.3	0.62	0.6	2.7	<LOD	137.3	<LOD	<LOD	<LOD

NPs: nonilfenoles; Di-n-BuF: di-n-butilftalato; BBP: butilbencilftalato; DEHP: dietilhexilftalato; EE2: etinilestradiol.

Bibliografía

Avdeef, A., K. Box J., Comer J. E. A., Hibbert C., Tam K.Y. (1998), Determination of liposomal membrane-water partitioning coefficients of ionizable drugs, *Pharmaceut Res*, 15(2), 209–215.

Barceló D. (2003) Emerging pollutants in water analysis, *TrAC Trend Anal Chem*, 22, xiv-xvi.

Baronti C., Curini R., D'Ascenzo G., Di Corcia A., Gentili A., Samperi R. (2000) Monitoring natural and synthetic estrogens at activated treatment plants and in receiving river water, *Environ Sci Technol*, 34, 5059–5066.

Belfroid A.C., Van der Horst A., Vethaak A.D., Schafer A.J., Ris G.B.J., Wegener J. (1999) Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in the Netherlands, *Sci Total Environ*, 225, 101–108.

Braun P., Moeder M., Schrader S., Popp P., Duschek P., Engewald W. (2003) Trace analysis of technical nonylphenol, bisphenol A and 17 α -etinylestradiol in wastewater using solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry, *J Chromatogr A*, 988, 41-51.

Campbell C.G., Borglin S.E., Green G.B., Grayson A., Wozel E., Stringfellow W.T. (2006) Biologically directed environmental monitoring, fate, and transport of estrogenic endocrine disrupting compounds in water: A review, *Chemosphere*, 65, 1265-1280.

Carballa M., Omil F., Lema J.M., Llompant M., García-Jares C., Rodríguez I., Gómez M., Ternes T. (2004) Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant, *Water Res*, 38, 2918.

Hao Ch., Zhao X., Yang P. (2007) GC-MS and HPLC-MS analysis of bioactive pharmaceuticals and personal-care products in environmental matrices, *TrAC Trend Anal Chem*, 26, 569-580.

Daughton C.G., Ternes T.A., (1999). Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change?, *Environ Health Perspect*, 107, 907–938.

Ellington J. J., Floyd T. L. (1996) Octanol/Water Partition Coefficients for Eight Phthalate Esters United States National Exposure Environmental Protection Research Laboratory Agency Athens, GA 30605-2700 Research and Development EPA/600/S-96/006.

Fenjin J., Yiwan M., Lihuian I., Shutao W. (2005) Trophodynamic Behavior of 4-Nonylphenol and Nonylphenol Polyethoxylate in a Marine Aquatic Food Web from Bohai Bay, North China: Comparison to DDTs, *Environ Sci Technol*, 39, 4801-4807.

Gatidou G., Thomaidis N. S., Stasinakis A. S., Lekkas T. D. (2007) Simultaneous determination of the endocrine disrupting compounds nonylphenol, nonylphenol ethoxylates, triclosan and bisphenol A in wastewater and sewage sludge by gas chromatography–mass spectrometry, *J Chromatogr A*, 1138, 32–41.

Gómez M.J., Martínez M.J., Lacorte S., Fernández-Alba A.R., Agüera A. (2007) Pilot survey monitorin pharmaceuticals and related compounds in a sewage tratment plant located on the Mediterranean coast, *Chemosphere*, 66, 993-1002.

Grayson A., Wozel E., Stringfellow W.T. (2006) Biologically directed environmental monitoring, fate, and transport of estrogenic endocrine disrupting compounds in water: A review, *Chemosphere*, 65, 1265-1280.

Hassan H. B., Mihaly K., István E., Zoltán A. (2004) Preparation and Investigation of Inclusion Complexes Containing Gemfibrozil and DIMEB, *J Incl Phenom Macro*, 50, 219–225.

Heberer T. (2002a). Occurrence, fate and removal of pharmaceuticals residues in the aquatic environment: a review of recent research data, *Toxicol Lett*, 131, 5–17.

Heberer T. (2002b) Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water, *J Hydrol*, 266, 175–189.

Henschel K.-P., Wenzel A., Diedrich M., Fliedner A. (1997) Environmental hazard assessment of Pharmaceuticals, *Regul Toxicol Pharmacol*, 25, 220–225.

Holthaus K.I.E., Johnson A.C., Jürgens M.D., Williams R.J., Smith J.J.L., Carter J.E. (2002) The potential for estradiol and ethinylestradiol to sorb to suspended and bed sediments in some English rivers, *Environ Toxicol Chem*, 21, 2526–2535.

Institute for Health and Consumer Protection (2003), European Chemicals Bureau, 4,4'-ISOPROPYLIDENEDIPHENOL (BISPHENOL-A) EINECS No: 201-245-8 Summary Risk Assessment Report, I-21020 Ispra (VA) Italy.

Jones O. A., Lester J. N., Voulvoulis N. (2005) Pharmaceuticals: a threat to drinking water? *Trends Biotechnol*, 23, 163-167.

Kim S.D., Cho J., Kim I.S., Vanderford B.J., Snyder S.A. (2007) Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters, *Water Res*, 41, 1013-1021.

Kitamura S., Suzuki T., Sanoh S., Kohta R., Jinno N., Sugihara K., Yoshihara S., Fujimoto N., Watanabe H., Ohta S. (2005) Comparative Study of the Endocrine-Disrupting Activity of Bisphenol A and 19 Related Compounds, *Toxicol Sci*, 84(2), 249-259.

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 U.S. Streams, 1999-2000: A National Reconnaissance, *Environ Sci Technol*, 36, 1202.

Kuch H.M., Ballschmitter K. (2001) Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the picogram per liter range, *Environ Sci Technol*, 35, 3201-3206.

Lai K.M., Johnson K.L., Scrimshaw M.D., Lester J.N. (2000) Binding of water-borne steroid estrogens to solid phases in river and estuaries systems, *Environ Sci Technol*, 34, 3490-3494.

Lee H.B., Peart T.E., Svoboda M.L. (2005) Determination of endocrine-disrupting phenols, acidic pharmaceuticals, and personal-care products in sewage by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry, *J Chromatogr A*, 1094, 122-129.

Lin W.C., Chen H.C., Ding W.H. (2005) Determination of pharmaceutical residues in waters by solid-phase extraction and large-volume on-line derivatization with gas chromatography-mass spectrometry, *J Chromatogr A*, 1065, 279-285.

Liu X., Tanaka H., Yamauchi A., Testab B., Chumana H. (2004) Lipophilicity Measurement by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC): A Comparison of Two Stationary Phases Based on Retention Mechanisms, *Helv Chim Acta*, 87, 2866.

Machatha S. G., Yalkowsky S. H. (2005) Comparison of the octanol/water partition coefficients calculated by ClogP®, ACDlogP and

KowWin[®] to experimentally determined values, *Int J Pharm*, 294, 185–192.

MITI (1992) Biodegradation and bioaccumulation data of existing chemicals based on the CSCL Japan. Japan Chemical Industry Ecology-Toxicology & Information Center.

Mouatassim-Souali A., Tamisier-Karolak S.L., Perdiz D., Cargouet M., Levi Y. (2003) Validation of a quantitative assay using GC-MS for trace determination of free and conjugated estrogens in environmental water samples, *J Sep Sci*, 26, 1005-111.

Nichols D.J., Daniel T.C., Edwards D.R., Moore P.A., Pote D.H. (1998) Use of grass filter strips to reduce 17 beta-estradiol in runoff from fescue-applied poultry litter, *J Soil Water Conserv*, 53, 74–77.

Peterson E.W., Davis R.K., Orndorff H.A. (2001) 17 β -Estradiol as an indicator of animal waste contamination in mantled karst aquifers, *J Environ Qual*, 29, 826–834.

Petrovic M., Hernando M. D., Díaz-Cruz M. S., Barceló D. (2005) Liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review, *J Chromatogr A*, 1067, 1–14.

Polo M., Llompart M., Garcia-Jares C., Cela R. (2005) Multivariate optimization of a solid-phase microextraction method for the analysis of phthalate esters in environmental waters, *J Chromatogr A*, 1072, 63–72.

Rabiet M., Togola A., Brissaud F., Seidel J.-L., Budzinski H., Elbaz-Poulichet F. (2006) Consequences of Treated Water Recycling as Regards Pharmaceuticals and Drugs in Surface and Ground Waters of a Medium-sized Mediterranean Catchment, *Environ Sci Technol*, 40, 5282-5288.

Rodríguez I., Quintana J.B., Carpinteiro J., Carro A.M., Lorenzo R.A., Cela R. (2003) Determination of acidic drugs in sewage water by gas chromatography–mass spectrometry as *tert*-butyldimethylsilyl derivatives, *J Chromatogr A*, 985, 265–274.

Schellenberg K., Leuenberger C., Schwarzenbach R.P. (1984) Sorption of phenols by natural and aquifer materials, *Environ Sci Technol*, 18, 652-657.

Shore L.S., Correll D.L., Chakraborty P.K. (1995) Relationship of fertilization with chick manure and concentrations of estrogens in small streams. In: K. Steele, Editor, *Animal waste and the land-water interface*, CRC Press, Boca Raton, FL, 155–162.

Sole M., López de Alda M.J., Castillo M., Porte C., Ladegaard-Pedersen K., Barceló D. (2000) Estrogenicity determination in sewage treatment plants and surface waters from the Catalonian area (NE Spain), *Environ Sci Technol*, 34, 5076–5083.

Tabata A., Kashiwa S., Ohnishi Y., Ishikawa H., Miyamoto N., Itoh M. (2001) Estrogenic influence of estradiol-17 β , p-nonylphenol and bisphenol A on Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) at detected environmental concentrations, *Water Sci Technol*, 43 (2), 109–116.

Ternes T. A. (1998) Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers, *Water Res*, 32, 3245–3260.

Ternes, T. A. (2001). Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples, *TrAC Trend Anal Chem*, 20, 419–434.

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.

U.S. Department of Health and Human Services (DHHS) (1993). Hazardous Substances Data Bank. National Toxicology Information Program, National Library of Medicine, Bethesda, MD.

Anexo. Concentraciones de analitos reportadas por diversos autores en diferentes países.

Compuesto	Características	País	Concentración en aguas superficiales Máximo-Mínimo (media)	Concentración en plantas de tratamiento		Concentración en aguas subterráneas	Concentración en agua potable	Método Analítico	Referencia
				INFLUENTE Max- Min (Media)	EFLUENTE Max-Min (Media)				
Bisfenol A	Estrógeno sintético	Canadá (µg/L)	0.5-14	2.40-0.21 (1.28)	0.45-0.02 (0.18)	3-1410 (19)	0.50-2.0	GC-MS	Lee <i>et al.</i> , (2005)
		USA (ng/L)	85-250 <3-230			20-44 (19)	20-44		Campbell <i>et al.</i> , (2006)
		(µg/L)	Max: 12 Media: 0.14					CLLE GC-MS	Kolpin <i>et al.</i> , (2002)
		España (µg/L)		3.4-0.72 (1.4)	0.98-0.14 (0.38)			SPE- GC-MS	Gómez, <i>et al.</i> , (2007)
	Alemania (µg/L)				3		SPE- GC-MS	Braun <i>et al.</i> , (2003)	
4-nonilfenol	Altera el sistema endócrino	Canadá (µg/L)		25-2.72 (14.6)	3.21-0.32 (0.70)			GC-MS	Lee <i>et al.</i> , (2005)
		Alemania (µg/L)			2.4			SPE- GC-MS	Braun <i>et al.</i> , (2003)
		USA (µg/L)	Max: 40 Media: 0.8					CLLE GC-MS	Kolpin <i>et al.</i> , (2002)
Triclosan	Agente antibacteriano y fungicida, agente desinfectante.	Canadá (µg/L)		1.83-0.87 (1.35)	0.36-0.05 (0.14)			GC-MS	Lee <i>et al.</i> , (2005)
		Corea del Sur (ng/L)			32-1.3 (12)			LC-MS/MS	Kim <i>et al.</i> (2007)
		España (µg/L)		4.2-0.39 (1.8)	0.40-0.08 (0.2)			SPE- GC-MS	Gómez, <i>et al.</i> , (2007)
		USA (µg/L)	Max: 2.3 Media: 0.14					CLLE GC-MS	Kolpin <i>et al.</i> , (2002)
Estrona	Estrógeno natural	Canadá (µg/L)		0.052-0.0008 (0.0016)	0.054- <0.001 (0.005)			GC-MS	Lee <i>et al.</i> , (2005)
		USA (ng/L)	0.10-4.1 1.1-3.0 <0.1-17 <0.4-2.12				0.20-0.6		Campbell, <i>et al.</i> , (2006)
		(µg/L)	Max: 0.112 Media: 0.027					CLLE GC-MS	Kolpin <i>et al.</i> , (2002)
		España (µg/L)		2.4	4.4			GC-MS	Carballa <i>et al.</i> , (2004)
		Corea del Sur (ng/L)	5.0-1.7 (3.6)		36-2.2 (14)			LC-MS/MS	Kim <i>et al.</i> , (2007)
		Francia		7 7.2 4.9 6.1	14.5 17.7 8.3 8.7			SPE- GC-MS	Braun <i>et al.</i> , (2003)

Compuesto	Características	País	Concentración en aguas superficiales Máximo-Mínimo (media)	Concentración en plantas de tratamiento		Concentración en aguas subterráneas	Concentración en agua potable	Método Analítico	Referencia	
				INFLUENTE Max- Min (Media)	EFLUENTE Max-Min (Media)					
Estradiol	Estrógeno natural	Canadá (µg/L)	1.9- 6.0	0.022-0.003 (0.009)	0.002-<0.001 (0.002)			GC-MS	Lee et al., (2005)	
		USA (ng/L)	0.15-3.6 1.4-3.2 <0.1-0.7			13-80	0.20-2.1		Campbell et al., (2006)	
		(µg/L)	Max: 0.2 Media: 0.16 Max: 0.093 Media: 0.0009						CLLE GC-MS	Kolpin et al., (2002)
		Corea del Sur (ng/L)		8.6 8.1 7.6 8.1	< 1.0 18.01 11.03 11.4 16.7				SPE- GC-MS	Lin, et al., (2005)
	Francia							SPE- GC-MS	Mouatassim-Souali et al., (2003)	
Ethinilestradiol	Anticonceptivo	USA (ng/L)	0.1-5.1 1.1-2.9				0.15-0.50		Campbell, et al., (2006)	
		(µg/L)	Max: 0.831 Media: 0.073					CLLE GC-MS	Kolpin, et al., (2002)	
		Corea del Sur (ng/L)		5.2 2.9 2 5	1.3 8.7 5.7 3.8 7			LC-MS/MS	Kim, et al., (2007)	
		Francia						SPE- GC-MS	Mouatassim-Souali et al., (2003)	
	Alemania (µg/L)				0.12			SPE- GC-MS	Braun, et al., (2003)	
Ibuprofeno	Analgésico Antiinflamatorio	Canadá (µg/L)		10.21-4010 (6.77)	2.17-0.11 (0.31)			GC-MS	Lee, et al., (2005)	
		Alemania (µg/L)	Max: 3.4 Media: 0.37					LC-GC-MS	Ternes, (1998)	
		Taiwan (ng/l)		0.1					SPE- GC-MS	Heberer (2002)
		España (µg/L)		5.70- 2.64 (3.69)	2.10-0.91 (1.32)			GC-MS	Lin, et al., (2005)	
		Corea del Sur (ng/L)		168-34 (84)	28-0.24 (7.1)			SPE- GC-MS	Carballa, et al., (2004)	
		USA (µg/L)	Max: 1 Media: 0.20		137-10 (65)			LC-MS/MS	Gómez, et al., (2007)	
							SPE- GC-MS	Kim, et al., (2007)		
								SPE- GC-MS	Kolpin, et al., (2002)	

Compuesto	Características	País	Concentración en aguas superficiales Máximo-Mínimo (media)	Concentración en plantas de tratamiento		Concentración en aguas subterráneas	Concentración en agua potable	Método Analítico	Referencia
				INFLUENTE Max- Min (Media)	EFLUENTE Max-Min (Media)				
Gemfibrozil	Regulador de lípidos	Canadá (µg/L)	Max: 0.15 Media: 0.40	36.51-0.12 (0.26)	2.09-0.08 (0.19)			GC-MS	Lee, et al., (2005)
		Alemania (µg/L)						LC-GC-MS	Ternes, (1998)
		Corea del Sur (ng/L)	9.1-1.8 (6.6)	0.07		17-3.9 (11.2)			LC-MS/MS
Ketoprofeno	Analgésico. Antiinflamatorio	USA (µg/L)	Max: 0.79 Media: 0.048	0.15-0.06 (0.08)	0.09-0.04 (0.05)			SPE- GC-MS	Kolpin, et al., (2002)
		Canadá (µg/L)		0.23		Max: 0.38 Media: 0.20		GC-MS	Lee, et al., (2005)
Diclofenaco	Antiinflamatorio	Alemania (µg/L)	Max: 2.1 Media: 0.81	2.45-0.05 (0.17)	0.25-0.07 (0.11)			GC-MS	Lee, et al., (2005)
		Corea del Sur (ng/L)	50 (ng/l)	3.02		2.51		LC-GC-MS	Ternes, (1998)
		España (µg/L)	68-11 (3)			127-8.8 (40)		LC-MS/MS	Heberer, (2002)
				3.6-0.2 (1.5)		2.2-0.14 (0.9)		SPE- GC-MS	Kim, et al., (2007)
Ácido Clofibrico	Regulador de lípidos	Alemania (µg/L)	Maximo: 1.6 Media 0.36	0.46				LC-GC-MS	Ternes, (1998)
			50 (ng/l)		0.48				Heberer, (2002)
Ac. Salicilico	Antiagregante plaquetario Analgésico Antiinflamatorio Antipirético	Canadá (µg/L)		12.7-2.82 (6.68)	0.32-0.01 (0.14)			GC-MS	Lee, et al., (2005)
		Alemania (µg/L)	Max: 0.14 Media: no detectable					LC-GC-MS	Ternes, (1998)
				0.04					Heberer, (2002)
Naproxeno	Analgésico Antiinflamatorio	Canadá (µg/L)		6.03-1.73 (2.76)	2.54-0.36 (0.82)			GC-MS	Lee, et al., (2005)
		Taiwan			170			SPE- GC-MS	Lin, et al., (2005)
		España (µg/L)		4.60-1.79 (3.28)	2.60-0.80 (1.75)			GC-MS	Carballa, et al., (2004)
		Alemania (µg/L)	Max: 0.52 Media: 0.30					LC-GC-MS	Ternes, (1998)
		Corea del Sur (ng/L)	18-1.8 (11)	0.1		483-20 (128)			LC-MS/MS
									Kim, et al., (2007)

2. Determinación de fragancias potencialmente alérgicas por microextracción en fase sólida

2.1 Introducción y resumen

Las fragancias son un grupo de sustancias químicas que contienen la mayoría de los productos cosméticos y de cuidado e higiene personal. El Comité Científico de los Productos de Consumo (CCPC), ha identificado 26 de estos ingredientes como posibles causantes de alergias de contacto (SCCNFP, 1999). Veinticuatro de estos alérgenos potenciales pueden ser analizados por GC, mientras que los otros dos son extractos naturales complejos (“oak moss” y “tree moss”) no aptos para determinación por GC.

La Directiva Europea de cosméticos, exige la indicación de la presencia de las fragancias alérgicas potenciales en los productos cosméticos cuando se exceden los umbrales de 0.01% y del 0.001% para los productos de aclarado (rinse-off) o de permanencia en la piel (leave-on), respectivamente (EU, 2009).

Entre los productos para el cuidado de los bebés, específicamente para el baño diario, se presentan champús, espumas de baño, geles de ducha y jabones, que contienen detergentes que pueden favorecer la afectación de compuestos irritantes o alérgicos. Durante el baño, la exposición de los niños a los productos químicos no se debe sólo a la absorción dérmica, sino también a la inhalación e ingestión, pudiendo tener repercusiones importantes en su salud.

Por otra parte, las piscinas han sido reconocidas recientemente como una fuente importante de exposición a contaminantes. Los estudios

epidemiológicos han confirmado un mayor riesgo de asma, tanto en piscinas cubiertas como al aire libre (Weisel et al., 2009). En el caso de alérgenos potenciales, se pueden transferir fácilmente al agua de piscina, ya que están presentes en todo tipo de cosméticos y lociones, incluyendo las de gama solar. Algunos de los alérgenos potenciales no sólo plantean el riesgo de causar alergias de contacto, sino también efectos sistémicos (Uehara et al., 2008).

Los métodos analíticos para la determinación de este grupo de sustancias se basan principalmente en cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) (Rastogi et al., 1999; Leijs et al., 2005; Bassereau et al., 2007; Niederer et al., 2006).

Se ha demostrado recientemente que la microextracción en fase sólida (SPME) es idónea para el análisis de las fragancias alérgenas (Lamas et al., 2009). El procedimiento propuesto ha permitido la determinación fiable de 15 fragancias en muestras de agua. También se ha aplicado la SPME para determinar la emisión de 13 fragancias alérgenas a partir de juguetes perfumados (Masuck et al., 2010).

El objetivo de este estudio es desarrollar un procedimiento basado en la microextracción en fase sólida (SPME) con cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) para el análisis de fragancias alérgenas incluyendo las 24 fragancias reguladas que pueden ser analizadas mediante cromatografía de gases.

Se han determinado 26 fragancias alérgenas incluyendo las reguladas por la Directiva 76/768/CEE de la Unión Europea en diferentes tipos de aguas mediante microextracción en fase sólida (SPME) y cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS). El procedimiento se basa en el muestreo en espacio de cabeza (HS-SPME) con fibras de

polidimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS/DVB) y previamente se optimizó mediante un diseño experimental. El método propuesto muestra una buena linealidad ($R \geq 0.994$), y precisión ($RSD \leq 12\%$). Los límites de detección ($S/N = 3$) variaron desde 0.001 hasta 0.3 ng mL⁻¹. La exactitud fue demostrada a través de la recuperación cuantitativa de los compuestos en muestras reales de agua, incluyendo aguas de baño de bebé, aguas de piscina y aguas residuales. La ausencia de efectos matriz permitió la cuantificación de los compuestos por calibración externa. El análisis de 35 muestras de diferentes tipos de aguas mostró la presencia de alérgenos en todas las muestras analizadas, con excepción del metileugenol y el alcohol cinamílico. Las concentraciones más altas de alérgenos se encontraron en el agua de baño de bebé, en las que se detectaron de 5 a 15 de los compuestos en concentraciones que van desde unos pocos pg mL⁻¹ a varios cientos de ng mL⁻¹.

2.2 Parte experimental

2.2.1 Reactivos, gases y disolventes

El metanol, acetato de etilo y acetona, fueron adquiridos de Merck (Darmstadt, Germany) y el cloruro de sodio se adquirió de VWR Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France). El agua ultrapura se obtuvo de un sistema de purificación Milli-Q (Millipore, Billerica, MA, USA). El dispositivo manual para SPME y la fibra de polidimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS/DVB) de 65 µm fueron suministrados por Supelco (Bellefonte, PA, USA). El gas portador utilizado para cromatografía fue helio (99.999%). Todos los disolventes y reactivos fueron de grado analítico. En la Tabla 2.1 se muestra la pureza y los proveedores de las fragancias.

Tabla 2.1. Fragancias alérgenas, pureza y proveedor.

Compuesto	Nombre comercial	Pureza	Proveedor
Linalol	3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol	97%	
β-citronelol	3,7-dimetil-6-en-1-ol	95%	
Eugenol	2-metoxi-4-prop-2-enil fenol	99%	
Metileugenol	1,2-dimetoxi-4-(2-propenil)-benceno	99%	
Cumarina	2H-1-benzopirran-2-ona	99%	
Farnesol	3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trien-1-ol	95 % (mezcla de isómeros)	
Citral	3,7-dimetil-2,6-dienal	95 % (cis/trans)	
(R)-(+)-Limoneno	1-metil-4-prop-1-en-2-il-ciclohexeno	97%	
Anís alcohol	4-metoxibenceno metanol	98%	
Isoeugenol	2-metoxi-4-(1-propenil) fenol	98 % (cis/trans)	
Cinamato de bencilo	3-fenil fenilmetil éster-2- ácido propenoico	99%	
Amil cinamal	2-(fenilmetileno)-heptanal	97%	
(-)-α -Pinenol	2,6,6-trimetilbenceno [3.1.1]hept-2-eno	≥ 99 %	
α-Isometil ionona	3-metil-4-(2,6,6-trimetil-2-ciclohexen-1-il)-3-buten-2-ona	≥ 85 %	
Geraniol	3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol	≥ 96 %	
Alcohol cinamílico	2-(fenilmetileno)-1-heptanol	≥ 85 %	
Lilial®	3-(4-tert-butilfenil)-2-metilpropanal	≥95 %	
Lyral®	4-(4-hidroxi-4-metilpentil) ciclohex-3-eno-1-carbaldehído	≥97 %	
Salicilato de bencilo	2-hidroxi-fenilmetil éster ácido benzoico	≥ 99 %	
Octanoato de 2-metilo	ácido 2-Octinoico, metil éster	≥ 99 %	
Hidroxicitronelal	7-hidroxi-3,7-dimetil-2-octanol	≥ 95 %	
Cinamaldehído	3-fenil-2-propenal	≥ 93 %	
Hexicinamaldehído	2-(fenilmetileno) octanal	≥95 %	
Alcohol bencilico	metanol benceno	99%	
Cinamil alcohol	3-fenil-2-propen-1-ol	98%	
Benzoato de bencilo	fenilmetil benzoato	98.50%	
			Aldrich (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany)
			Fluka (Fluka Chemie GmbH, Steinheim, Germany)
			SAF Supply Solutions (St. Louis, USA)
			Chem Service (West Chester, USA)

2.2.2 Patrones

Se prepararon disoluciones patrón individuales de cada compuesto en metanol y a partir de ellas, una disolución mezcla de todos los analitos en acetona. Esta disolución se empleó para las fortificaciones en agua. Las disoluciones estándar de trabajo se prepararon por dilución a la concentración requerida y se almacenaron en viales ámbar a -20 °C.

2.2.3 Muestras

Se analizaron diferentes muestras de agua: baño de bebe, piscina y aguas residuales. Las muestras se recogieron en frascos ámbar. El exceso de cloro residual en las muestras se eliminó por la adición de tiosulfato de sodio (0.1 mg mL^{-1}). Todas las muestras se almacenaron a 4 °C.

2.2.4 Procedimiento de SPME

Se introducen alícuotas de 10 ml de la muestra de agua en viales de 22 mL que contienen cloruro de sodio (2 g). A continuación, los viales se sellan con tapones de aluminio con septa recubiertos de Teflón y se sumergen en un baño de agua termostatzado. Las muestras se estabilizan durante 5 minutos antes de exponer la fibra de PDMS/DVB durante 20 minutos. En el procedimiento optimizado, las muestras se extraen a 100 °C en el modo de espacio de cabeza. Las muestras se someten a agitación magnética, durante el proceso de extracción. Una vez terminado el período de exposición, la fibra se retrae en la aguja del dispositivo de SPME e inmediatamente se inserta en el inyector del

cromatógrafo. La desorción se lleva a cabo a 220 °C durante 5 min. Se analizaron blancos periódicamente, para confirmar la ausencia de contaminación.

2.2.5 Limpieza de material y acondicionamiento de fibras de SPME

El protocolo seguido para la limpieza del material de vidrio consintió en lavados sucesivos con agua de grifo y con jabón libre de fosfatos. A continuación, el material se enjuagó varias veces con agua de grifo, agua Milli-Q, acetona y metanol. Finalmente, todo el material (excepto el material de vidrio volumétrico) se secó en estufa. Como medida de precaución, ningún vial utilizado en las extracciones por SPME que estuviese en contacto con los analitos se reutilizó.

Los clavos empleados para la agitación de las muestras en SPME no se reutilizaron, si no que se desecharon como residuos sólidos una vez realizado el análisis. Sin embargo, requirieron una limpieza previa a su utilización consistente en tres lavados sucesivos en un baño de ultrasonidos durante 15 minutos con una mezcla de disolventes metano:acetona:hexano (1:1:1, v/v).

Antes de utilizar por primera vez la fibra de SPME es necesario acondicionar los recubrimientos, para evitar la aparición de picos cromatográficos no deseados. Este acondicionamiento se llevó a cabo exponiendo la fibra a temperatura elevada bajo corriente de gas inerte en el puerto de inyección de un cromatógrafo de gases (distinto al utilizado para los análisis) siguiendo las condiciones de temperatura y tiempo recomendadas por el fabricante para cada recubrimiento de fibra.

Todos los días, antes de comenzar a realizar los análisis, el recubrimiento de la fibra a utilizar se desorbió en el inyector de un cromatógrafo de gases durante 5 min a la temperatura de trabajo. Del mismo modo, para evitar posible efecto memoria entre prueba y prueba, las fibras se desorbieron entre análisis consecutivos.

2.2.6 Gestión de residuos

Los residuos generados durante el proceso experimental se clasificaron en sólidos y líquidos. Los residuos sólidos incluyen: material de plástico desechable, viales, pipetas pasteur y clavos empleados como agitadores, se almacenaron en contenedores de residuos sólidos de 100 L. Los residuos líquidos se separaron en acuosos y orgánicos, y se almacenaron por separado en bidones de 25 L. Además, los residuos de disolventes orgánicos se separaron en clorados y no clorados. Todos los contenedores de residuos debidamente etiquetados fueron recogidos y gestionados para su disposición final por la Unidad de Gestión de Residuos de la Universidad de Santiago de Compostela.

2.2.7 Análisis cromatográfico y detección

El análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) se realizó en un cromatógrafo de gases VARIAN 450-GC (Varian, Walnut Creek, CA, EE.UU.) acoplado a un espectrómetro de masas de trampa iónica Varian 240-MS con un waveboard para múltiples análisis MS (MS^n) y equipado con un inyector automático CP-8400 (Tabla 2.2).

El sistema se controla mediante el software Varian MS Workstation v6.9.1.

Tabla 2.2. Condiciones instrumentales empleadas en el GC-MS.

Cromatógrafo de gases VARIAN 450-GC	
Inyector	Split/splitless
Temperatura	220 °C
Modo de inyección	Splitless
Tiempo de splitless	2 min
Flujo de Split	20 mL min ⁻¹
Columna	capilar HP5
Fase estacionaria	(5% fenil, 95% dimetil)polisiloxano
Dimensiones	30 m × 0.32 mm x 0.25 µm
Programa de temperaturas	
Temperatura inicial	45 °C (2 min)
Rampa de temperatura 1	8 °C min ⁻¹ hasta 100 °C
Rampa de temperatura 2	20 °C min ⁻¹ hasta 150 °C
Rampa de temperatura 3	25 °C min ⁻¹ hasta 200 °C (5 min)
Rampa final	8 °C min ⁻¹ hasta 233 °C
Tiempo total de análisis	22.5 min
Gas portador	He
Flujo en columna	1.0 mL min ⁻¹ (constante)
Detector: Espectrómetro de masas, trampa de iones VARIAN 240-MS	
Ionización MS	
Modo de ionización	Impacto electrónico (EI, +70 eV)
Modo de adquisición	Full scan
Intervalo de masas	39-400 m/z
Velocidad de barrido	3 µscans
Temperatura interfase	280 °C
Temperatura trampa de iones	150 °C
Temperatura fuente de iones	200 °C
Temperatura manifold	40 °C
Corriente del filamento de emisión	25 µA
Voltaje del multiplicador	1700 V

La Tabla 2.3 resume los tiempos de retención, así como los iones de identificación y cuantificación de las fragancias.

Tabla 2.3. Tiempos de retención, iones de cuantificación e identificación.

Clave	Tiempo de retención (min)	Compuesto	Iones de cuantificación (m/z)	Iones de identificación
1	6.66	Pineno	77,93	41,77,93,121
2	8.65	Limoneno	67,93	39,67,93,136
3	8.95	Alcohol bencílico	77,79,108	77,79,108
4	9.84	Linalol	43,71,93	43,71,55,93
5	11.08	Octanoato de 2-metilo	67,79,95	67,79,93,95
6	11.36	Citronelol	41,67,69	41,67,69,81
7	11.50; 11.77	Citral	39,41,69	39,41,69,84
8	11.59	Geraniol	41,69	41,69,93,123
9	11.87	Cinamaldehído	77,103,131	51,77,103,131
10	11.92	Hidroxicitronelal	43,59,71	41,43,59,71
11	11.97	Anis alcohol	77,109,138	77,109,137,138
12	12.14	Cinamil alcohol	78,91,92	78,91,92,134
13	12.47	Eugenol	164	103,131,164
14	12.78	Metileugenol	178	147,163,178
15	12.85; 13.12	Isoeugenol	164	77,103,164
16	13.16	Cumarina	118,146	89,118,146
17	13.28	α -isometil ionona	93,121,136	93,121,135,136
18	13.62	Lilial [®]	189	131,147,189
19	14.16	Amil cinamal	129	117,129,202
20	14.62	Lyrál [®]	79,91,93	79,91,93,136
21	14.74	Alcohol cinamílico	91,133	91,115,129,133
22	14.94	Farnesol	41,69	41,69,81,121
23	15.32; 15.57	Hexilcinamaldehído	129,216	117,129,216
24	15.64	Benzoato de bencilo	105,194	77,91,105,194
25	16.94	Salicilato de bencilo	91	39,65,91
26	20.75	Cinamato de bencilo	91,131	91,131,192

2.3 Optimización del proceso

La idoneidad de la técnica de SPME para la determinación de 15 fragancias alérgicas se había demostrado previamente en el grupo de investigación donde se realizó este trabajo de tesis, destacando la importancia del modo de extracción y la temperatura en la eficiencia de extracción. Por lo tanto, la optimización de las condiciones de SPME para la extracción simultánea de los 26 analitos se centró en estos dos parámetros, aplicando una estrategia multivariada para evaluar los posibles efectos de segundo orden. Se seleccionó un diseño experimental de 3×2 , que permite estudiar la temperatura en tres niveles (50, 75 y 100 °C) y dos modos de extracción: espacio de cabeza (HS) e inmersión (IM). Los experimentos se realizaron con alícuotas de 10 mL de agua fortificada con los analitos a una concentración de 10 ng ml⁻¹. El tiempo de muestreo fue de 20 minutos, se adicionó cloruro de sodio 20% (m/V) y se utilizó agitación magnética para favorecer la transferencia de masa en el medio acuoso. El análisis numérico de los datos resultantes del diseño experimental se realizó con el paquete estadístico Statgraphics Centurion XV (Manugistics, Rockville, MD, EE.UU.).

Las condiciones óptimas obtenidas para los 26 compuestos se resumen en la Tabla 2.4. Se puede observar que la extracción de 17 de los 26 compuestos se vio favorecida por temperaturas altas (> 75 °C). El modo de extracción de espacio de cabeza es el más adecuado para la mayoría de los compuestos; únicamente ocho compuestos muestran una respuesta mayor en el modo de SPME directa.

Tabla 2.4. Condiciones óptimas para temperatura y modo de microextracción.

Clave	Compuesto	Temperatura (°C)	Modo de extracción
1	Pineno	50	HS
2	Limoneno	50	HS
3	Alcohol bencílico	50	IM
4	Linalol	66.8	HS
5	Octanoato de 2-metilo	55.9	HS
6	Citronelol	86.3	HS
7	Citral	89.5	HS
8	Geraniol	92.8	HS
9	Cinamaldehído	57.4	IM
10	Hidroxicitronelal	53.7	IM
11	Anis alcohol	100	HS
12	Cinamil alcohol	50	IM
13	Eugenol	75.9	IM
14	Metileugenol	100	HS
15	Isoeugenol	81.7	HS
16	Cumarina	50	IM
17	α -isometil ionona	81.7	HS
18	Lilial [®]	100	HS
19	Amil cinamal	100	HS
20	Lyril [®]	100	IM
21	Alcohol cinamílico	100	HS
22	Farnesol	100	HS
23	Hexilcinamaldehído	100	HS
24	Benzoato de bencilo	100	HS
25	Salicilato de bencilo	81.7	HS
26	Cinamato de bencilo	100	IM

En la Figura 2.1 se muestran los gráficos de los efectos principales para varios compuestos representativos. En ellos se muestran los efectos principales con una línea trazada entre el nivel bajo y alto de los respectivos factores. La longitud de la línea es proporcional a la magnitud del efecto del factor en el proceso de extracción, y el signo de la pendiente indica el nivel del factor que produce la respuesta mayor. La influencia determinante del modo de extracción y de la temperatura

sobre la respuesta, se aprecia claramente para la mayoría de los compuestos.

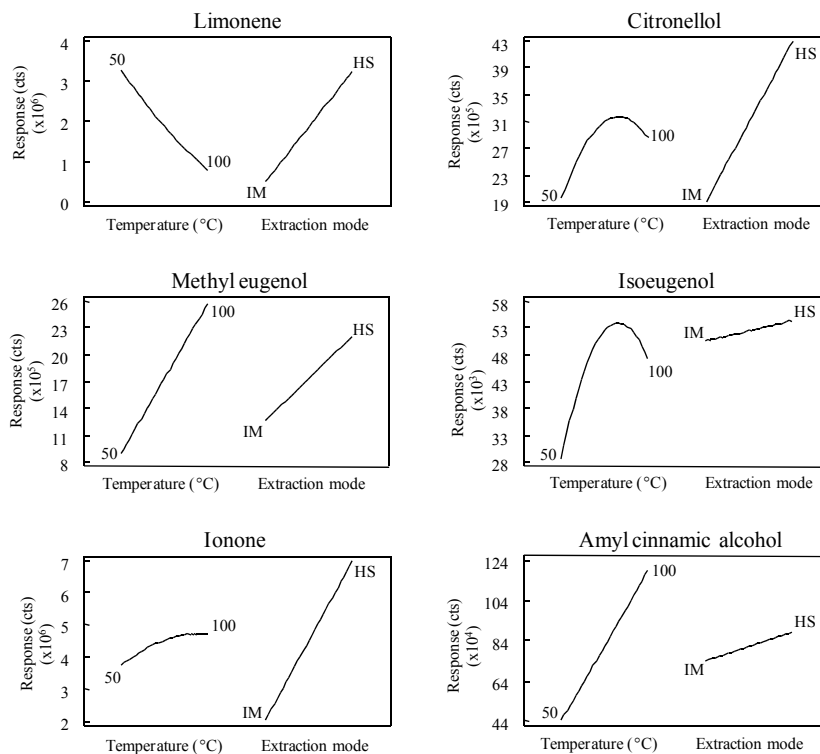


Figura 2.1. Gráfico de efectos principales para algunos compuestos seleccionados.

Los compuestos más volátiles como el pineno y limoneno, se extraen mejor a 50 °C, mientras que los compuestos con puntos de ebullición altos requieren temperaturas más elevadas (ver Tabla 2.4). En la Figura 2.1 se aprecia esta tendencia, aunque se observan varias excepciones ya que compuestos como el alcohol bencílico, cinamaldehído o cumarina (ver Tabla 2.4) se extraen mejor a temperaturas bajas. La extracción en el modo de espacio de cabeza generalmente fue más favorable para la mayoría de los compuestos, con algunas excepciones

(véase la Tabla 2.4). La interacción entre el modo de extracción y la temperatura, se muestra en la Figura 2.2. Los compuestos más volátiles (pineno y limoneno) deben ser extraídos en el modo espacio de cabeza, y para estos dos compuestos la respuesta obtenida a 100 °C es claramente baja independientemente del modo de extracción. Un comportamiento muy diferente se presenta para el alcohol bencílico o cinamaldehído, que son extraídos mejor en el modo directo, pero sólo si la temperatura se mantiene a 50 °C; si la temperatura de extracción es de 100 °C, la eficiencia de extracción es mayor en el modo HS. El alcohol cinámico y farnesol son ejemplos de compuestos que requieren temperaturas más altas. Estos compuestos se extraen con una eficiencia muy baja a 50 °C, independientemente del modo de extracción. Se puede apreciar que para algunos compuestos la diferencia de eficacia entre el modo directo y HS es muy reducida en función de la temperatura. Las condiciones óptimas para la extracción de eugenol fueron 76 °C y por inmersión (Tabla 2.4). Sin embargo, su interacción (ver Figura 2.2) muestra que a temperaturas próximas a 100 °C la eficacia de la extracción es similar para ambos modos de extracción. De la misma manera, el cinamato de bencilo mostró condiciones óptimas a 100 °C y por inmersión (Tabla 2.4), pero el análisis del gráfico de interacción muestra que para ambos modos de extracción la respuesta es similar a 100 °C; la SPME directa sólo es mejor que el HS-SPME si la extracción se realiza a 50 °C. Estos resultados permiten concluir que las mejores condiciones para la determinación simultánea de las fragancias alérgicas en agua implica la extracción en modo espacio de cabeza (HS) a 100 °C.

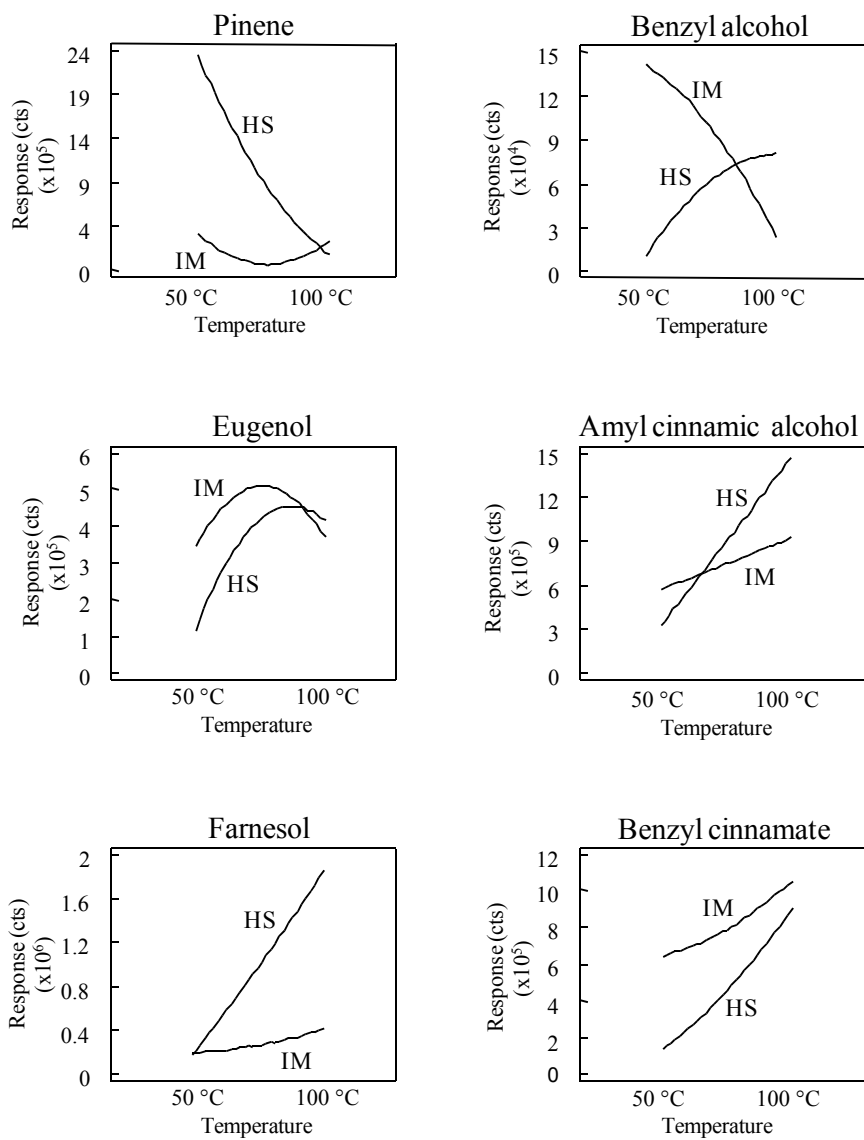


Figura 2.2. Efectos combinados de factores para algunos compuestos seleccionados.

2.4 Parámetros analíticos de calidad del método

La linealidad instrumental GC-MS se evaluó mediante la inyección de los analitos a diferentes concentraciones en acetato de etilo ($1\text{-}50\ \mu\text{g mL}^{-1}$, volumen de inyección de $2\ \mu\text{l}$, 6 niveles de calibración). La linealidad fue satisfactoria en el rango de concentración estudiado, con coeficientes de correlación que van desde 0.993 hasta 0.999. La repetibilidad ($n = 5$) expresada en términos de la desviación estándar relativa (RSD) fue inferior al 4.4%. En la Figura 2.3 se muestra un cromatograma de una mezcla estándar de las 26 fragancias alérgenas ($10\ \mu\text{g mL}^{-1}$).

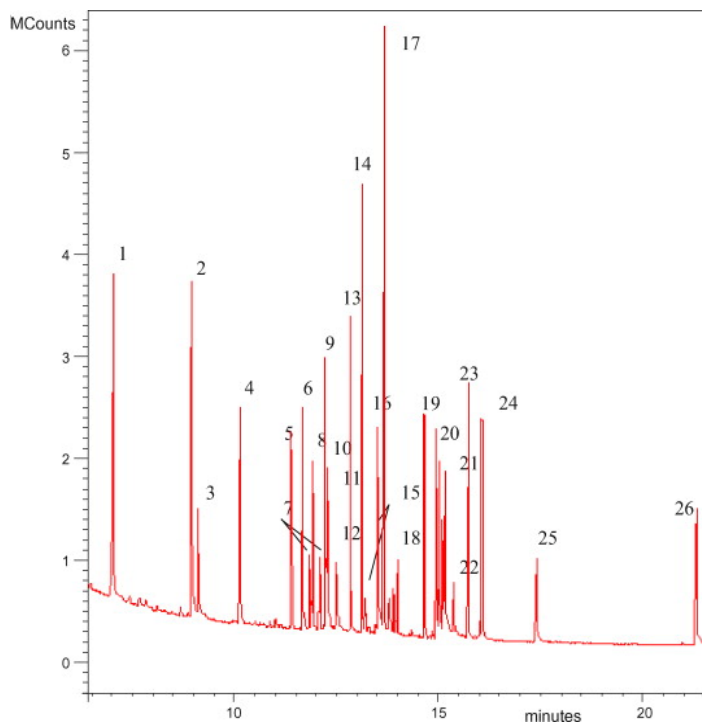


Figura 2.3. Cromatograma GC-MS obtenido por inyección directa de los alérgenos ($10\ \mu\text{g mL}^{-1}$) en acetato de etilo (ver claves en la Tabla 2.3).

La linealidad del método completo se evaluó mediante un estudio de calibración en las condiciones óptimas de SPME. El rango de calibración se estableció a partir de 0.01, 0.1 ó 0.5 ng ml⁻¹ (en función de los límites individuales de cuantificación) a 50 ng mL⁻¹, con 6-7 niveles de calibración. El método presentó una relación directamente proporcional entre la cantidad extraída de cada alérgeno y su concentración inicial en la muestra, con coeficientes de correlación (R) que van desde 0.9944 hasta 0.9998 (Tabla 2.5).

La precisión del procedimiento experimental se evaluó a cuatro niveles de concentración: 1, 5, 10 y 20 ng ml⁻¹. Los resultados mostraron una buena precisión intra-día e inter-día, con valores de desviación estándar relativa (RSD) en general, inferiores al 10% (véase Tabla 2.5).

Los límites de detección (LOD, relación señal/ruido de 3) y límites de cuantificación (LOQ, relación señal/ruido de 10) del método también se presentan en la Tabla 2.5. Estos límites están en los sub-ng mL⁻¹, con dos excepciones (anís alcohol y Lyrat[®]).

Tabla 2.5. Precisión, linealidad, límites de detección y de cuantificación del método SPME.

Compuesto	Precisión Intra-día (%RSD, n = 3)			Precisión Inter-día (%RSD, n = 5)			Linealidad (R)	LOD (ng mL ⁻¹)	LOQ (ng mL ⁻¹)
	1 ng mL ⁻¹	5 ng mL ⁻¹	20 ng mL ⁻¹	5 ng mL ⁻¹	10 ng mL ⁻¹	20 ng mL ⁻¹			
Pineno	3.6	3.8	9.7	4	11	8.6	0.9963	0.10	0.35
Limoneno	1.7	4.2	4.1	6.2	5.1	9.7	0.9993	0.006	0.021
Alcohol bencílico	2.8	5.7	1.0	9.7	13	11	0.9974	0.19	0.63
Linalol	2.2	7.8	1.0	6.4	12	4.6	0.9990	0.009	0.031
Octanoato de 2-metilo	5.2	4.1	9.6	8.6	12	8.6	0.9960	0.13	0.42
Citronelol	4.2	5.4	0.8	8.7	7.9	6.5	0.9988	0.021	0.069
Cítral	0.7	0.7	0.6	1.2	3.4	2.9	0.9982	0.042	0.14
Geraniol	3.5	8.9	0.7	6.6	5.3	2.5	0.9981	0.048	0.16
Cinamaldehído	2.1	4.7	1.0	7.7	12	4.3	0.9995	0.06	0.20
Hidroxicitronelal	8.9	5.7	3.6	4.3	11	3.7	0.9944	0.20	0.67
Anis alcohol	n.a.	4.7	7.1	3.6	11	6.0	0.9961	0.94	3.1
Cinamil alcohol	7.3	3.8	5.9	5.3	5.4	7.5	0.9997	0.14	0.46
Eugenol	8.9	5.5	2.8	6.5	6.6	3.9	0.9994	0.012	0.040
Metileugenol	0.9	1.4	2.7	2.5	2.7	7.3	0.9995	0.003	0.010
Isoeugenol	12	4.7	3.0	6.3	0.6	2.4	0.9963	0.038	0.13
Cumarina	2.7	4.6	4.3	7.1	7.7	3.7	0.9991	0.19	0.63
α-isometil ionona	1.9	3.8	0.9	7.0	2.5	0.8	0.9974	0.001	0.003
Lilial®	2.4	5.3	1.6	4.8	4.8	3.0	0.9988	0.004	0.013
Amil cinamal	0.7	0.5	2.5	4.6	8.9	3.7	0.9998	0.001	0.004
Lyrál®	n.a.	7.0	1.5	11	17	3.2	0.9998	1.1	3.6
Alcohol cinamílico	4.0	4.6	0.8	5.9	5.5	4.3	0.9965	0.055	0.18
Farnesol	10	4.5	1.4	7.1	6.3	1.9	0.9996	0.30	1.0
Hexilcinamaldehído	7.8	5.2	2.5	4	8.8	3.3	0.9991	0.002	0.007
Benzoato de bencilo	5.3	5.8	3.6	8.9	7.5	2.9	0.9989	0.003	0.010
Salicilato de bencilo	6.3	3.2	7.6	11	3.2	9.2	0.9983	0.009	0.029
Cinamato de bencilo	2.3	1.3	6.8	12	15	5.3	0.9993	0.008	0.025

2.5 Análisis de muestras reales

El método se aplicó al análisis de 35 muestras de agua de las cuales 22 fueron muestras de agua de baño de bebé (W1-W22), 4 muestras de agua de piscina interior (W23-W26), y 9 de aguas residuales (W27-W35). Para determinar el efecto matriz y la recuperación se seleccionaron tres muestras, una de baño de bebé, una de piscina y un agua residual.

La recuperación aparente se calculó como el cociente entre la concentración medida (después de restar la concentración inicial de la muestra no-fortificada) y la concentración fortificada, expresada en porcentaje. Las concentraciones se calcularon por calibración externa utilizando estándares de agua ultrapura. Las recuperaciones se muestran en la Tabla 2.6 y oscilaron entre el 80 y el 120% para la mayoría de los compuestos. Estas recuperaciones se pueden considerar cuantitativas, y por lo tanto, no se observaron efectos matriz, lo que permite la cuantificación por calibración externa acuosa.

Tabla 2.6. Porcentaje de recuperación de tres muestras diferentes de agua fortificadas con 20 ng mL⁻¹ (baño), 5 ng mL⁻¹ (piscina) y 10 ng mL⁻¹ (residual).

Compuesto	Baño	Piscina	Agua residual
Pineno	116 ± 11	100 ± 6	113 ± 11
Limoneno	100 ± 7	85 ± 15	112 ± 7
Alcohol bencílico	106 ± 7	90 ± 12	78 ± 11
Linalol	90 ± 1	90 ± 3	81 ± 10
Octanoato de 2-metilo	87 ± 3	115 ± 4	88 ± 7
Citronelol	83 ± 6	90 ± 3	85 ± 10
Citral	85 ± 2	101 ± 4	89 ± 5
Geraniol	104 ± 5	106 ± 6	96 ± 7

Compuesto	Baño	Piscina	Agua residual
Cinamaldehído	88 ± 6	100 ± 4	103 ± 13
Hidroxicitronelal	99 ± 8	136 ± 8	110 ± 5
Anis alcohol	121 ± 5	117 ± 14	120 ± 10
Cinamil alcohol	103 ± 13	78 ± 1	106 ± 1
Eugenol	103 ± 5	107 ± 2	106 ± 15
Metileugenol	79 ± 5	104 ± 2	95 ± 7
Isoeugenol	96 ± 9	85 ± 3	80 ± 7
Cumarina	116 ± 1	107 ± 2	87 ± 10
α-isometil ionona	73 ± 1	91 ± 3	92 ± 1
Lilial [®]	87 ± 2	83 ± 10	92 ± 3
Amil cinamal	86 ± 4	n.a.	85 ± 8
Lyril [®]	96 ± 4	107 ± 7	124 ± 17
Alcohol cinamílico	88 ± 5	109 ± 9	98 ± 3
Farnesol	120 ± 12	78 ± 4	106 ± 15
Hexilcinamaldehído	88 ± 3	105 ± 2	84 ± 2
Benzoato de bencilo	103 ± 6	103 ± 3	100 ± 2
Salicilato de bencilo	122 ± 12	107 ± 9	122 ± 10
Cinamato de bencilo	79 ± 4	101 ± 7	108 ± 7

Finalmente, los compuestos estudiados se determinaron en una amplia gama de muestras de agua. Las muestras de agua de baño para bebé se obtuvieron en hogares de Galicia durante el baño diario de niños de pocos meses a tres años. En la preparación del baño para bebés se usaron productos destinados a bebés y niños en cantidades habituales e incluyen champús, baños de burbujas y jabones hidratantes. Las muestras de aguas residuales son de distintos orígenes incluyendo muestras de vertederos de lavaderos colectivos (W27, W28); así como el influente (W29-W31) y el efluente (W32, W33) de estaciones depuradoras de aguas residuales, en Galicia, España. También se analizaron muestras tomadas en el emisor central de la ciudad de México (W34) y en el manantial de Cerro Colorado (W35) que es

alimentado por la infiltración natural del riego agrícola con aguas residuales provenientes de la ciudad de México.

Los resultados del análisis se muestran en la Tabla 2.7. Se observa que todos los compuestos de interés se detectaron en alguna de las muestras con excepción del alcohol cinamílico y el metileugenol. Los compuestos se han encontrado en concentraciones que van desde 0.003 hasta 845 ng mL⁻¹. Cabe señalar que en las muestras de agua de baño se encontraron concentraciones elevadas de varios compuestos, alcanzando valores incluso por encima de 100 ng mL⁻¹. En las muestras de agua de piscina, las fragancias alérgicas se encontraron en concentraciones, generalmente por debajo de 0.1 ng mL⁻¹. En la Figura 2.4 se muestra el cromatograma obtenido para una muestra de agua de baño de bebé.

Tabla 2.7. Concentración de fragancias alérgicas en muestras de agua (ng mL⁻¹).

Compuesto	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8	W9	W10	W11	W12	W13	W14	W15	W16	W17	W18	W19	W20	W21	W22		
Pineno												8.6								37	1.1			
Limoneno	0.57	0.10	0.03	2.6	0.41	0.24	0.08	0.55	1.1	1.8	56	0.42	5.5	1.7	28	152	12	0.07						
Alcohol bencílico	1.3	14	43						845				30									361		
Linalol	8.6	0.28	1.4	0.38	0.76	12	13	47	4.5	12	8.0	6.7	59	6.4	0.15									
Octanoato de 2-metilo	2.0	1.8	3.1																			3.5	1.8	
Citronelol	0.45	0.09	0.07	0.25	0.11	8.5	1.7	3.5	34	1.5	0.10	29	2.3	2.5	13	1.5								
Citral	1.9	1.4	8.9	8.8	3.0	4.8	1.0	0.40	0.50	0.82	0.65	0.64	41	1.4	4.0	6.3	2.1	1.0						
Geraniol	2.4							4.5	2.8	25	28	2.4	1.1	7.2	7.38									
Cinamaldehído	0.28	0.35									1.5													
Hidroxicitronelal	4.4	1.7	6.5	16	8.7	12	2.5				103	20	31	177	5.1	25	4.5	29						
Anis alcohol				8.3	13																			
Cinamil alcohol				129	7.1																		31	
Eugenol				3.8	3.8	0.72	1.7	0.80	6.1	7.0														
Isoeugenol	0.82																							
Cumarina				6.1	157	43																	25	
α-isometil ionona	0.13			0.61	0.02	4.1	11																5.9	
Lilial®	0.07	0.12	0.09	0.14	0.61	0.58	0.38	0.91	1.1	0.26	0.43	0.26	2.8	0.65	0.20	0.25	6.3							
Lyrall®																							42	
Farnesol	2.3	2.0	11	6.2	9.7	5.8	49	25	4.8	27	28	24	27	74	17	28	51	66	2.8					
Hexicinamaldehído	0.19	3.0	0.34		0.50	0.22	0.21	29	0.21														0.11	0.12
Benzoato de bencilo		0.12			1.2																			
Salicilato de bencilo				0.12	5.9	0.40	0.19	0.81	4.1															
Cinamato de bencilo	0.04																							
																							0.03	

Celdas vacías: compuestos no detectados (<LOD).
(a) Valores estimados (<LOD).

Tabla 2.7. Concentración de fragancias alérgicas en muestras de agua (ng mL⁻¹) (continuación).

Compuesto	W23	W24	W25	W26	W27	W28	W29	W30	W31	W32	W33	W34	W35
Pineno													
Limoneno	0.03	0.03		0.86	0.16	0.23				0.078	0.36	0.23	
Alcohol bencílico													
Linalol						0.051					0.21		
Octanoato de 2-metilo													
Citronelol				0.044a	0.032a		0.64						
Citral			0.19										
Geraniol													
Cinamaldehído													
Hidroxicitronelal				0.68	1.80								
Anis alcohol													
Cinamil alcohol				1.1	0.49			1.1					
Eugenol					0.051								
Isoeugenol						0.19			0.74				
Cumarina													
α -isometil ionona	0.003	0.004				0.031	0.032	0.36	0.032	0.024	0.10	0.20	0.19
Lilial®	0.097	0.033	0.19	0.69	0.035	0.037	0.041	0.23	0.031	0.066	0.11	0.40	0.20
Amil cinamal				0.050		0.022							
Lyral®													
Farnesol					0.33a								
Hexilcinamaldehído	0.051		0.071	0.087		0.028							
Benzoato de bencilo	0.070		0.033	0.074		0.18							
Salicilato de bencilo													
Cinamato de bencilo													

Celdas vacías: compuestos no detectados (<LOD).

(a) Valores estimados (<LOQ)

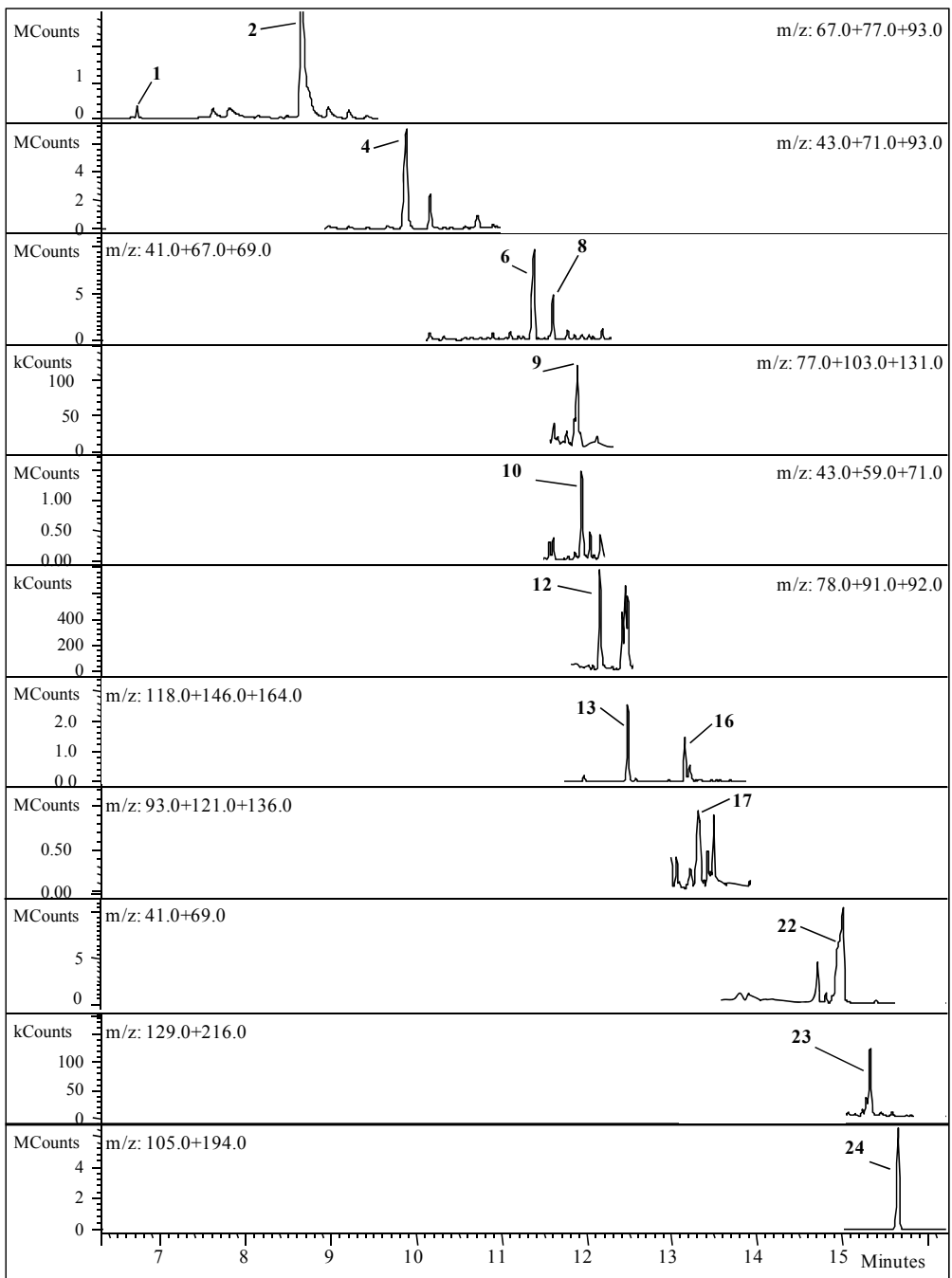


Figura 2.4. Cromatograma extraído de la muestra (W13) de baño de bebe. (Ver claves numéricas en Tabla 2.4 y la concentración de los compuestos en la Tabla 2.7.)

Bibliografía

Bassereau M., Chaintreau A., Duperrex S., Joulain D., Leijs H., Loesing G., Owen N., Sherlock A., Schippa C., Thorel P.J., Vey M. (2007) GC-MS Quantification of Suspected Volatile Allergens in Fragrances. 2. Data Treatment Strategies and Method Performances, *J Agric Food Chem*, 55, 25-31.

COUNCIL DIRECTIVE of 27 July 1976 on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products 76/768/EEC.

Dunn M.S., Vulic N., Shellie R.A., Whitehead S., Morrison P., Marriott P.J (2006) Targeted multidimensional gas chromatography for the quantitative analysis of suspected allergens in fragrance products, *J Chromatogr A*, 1130, 122-129.

EU (2009) Regulation (EC) No. 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on Cosmetic Products (recast). Official Journal of European Union L342, 59.

García-Jares C., Llompart M., Polo M., Salgado C., Macías S., Cela R. (2002) Optimisation of a solid-phase microextraction method for synthetic musk compounds in water, *J Chromatogr A*, 963, 277-285.

Johnson J.D., Ryan M.J., Toft J.D., Graves S.W., Hejtmancik M.R., Cunningham M.L., Herbert R., Abdo K.M. (2000) Two-Year Toxicity and Carcinogenicity Study of Methyleugenol in F344/N Rats and B6C3F₁ Mice, *J Agric Food Chem*, 48, 3620-3632.

Lamas J.P., Sanchez-Prado L., Garcia-Jares C., Llompart M. (2009) Solid-phase microextraction gas chromatography–mass spectrometry determination of fragrance allergens in baby bathwater, *Anal Bioanal Chem*, 394, 1399–1411.

Leijs H., Broekhans J., van Pelt L., Mussinan C. (2005) Quantitative Analysis of the 26 Allergens for Cosmetic Labeling in Fragrance Raw Materials and Perfume Oils, *J Agric Food Chem*, 53, 5487-5491.

Masuck I., Hutzler C., Luch A. (2010) Investigations on the emission of fragrance allergens from scented toys by means of headspace solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry, *J Chromatogr A*, 1217, 3136-3143.

Mondello L., Casilli A., Tranchida P.Q., Sciarrone D., Dugo P., Dugo G. (2008) Analysis of Allergens in Fragrances using Multiple Heart-cut Multidimensional Gas Chromatography–Mass Spectrometry, *LC-GC Europe*, 21, 130-140.

Niederer M., Bollhalder R., Hohl C. (2006) Determination of fragrance allergens in cosmetics by size-exclusion chromatography followed by gas chromatography-mass spectrometry, *J Chromatogr A*, 1132, 109–116.

Opinion concerning Oakmoss/Treemoss Extracts And Appropriate Consumer Information adopted by the SCCNFP during the 14th plenary meeting of 24 October 2000.

Rastogi S.C., Johansen J.D., Menné T., Frosch P., Bruze M., Andersen K.E., Lepoittevin J.P., Wakelin S., White I.R. (1999) Contents of fragrance allergens in children's cosmetics and cosmetic-toys, *Contact Dermatitis*, 41, 84-88.

SCCNFP (1999), SCCNFP/0017/98 Final FRAGRANCE ALLERGY IN CONSUMERS.

Shellie R., Marriott P., Chaintreau A. (2004) Quantitation of suspected allergens in fragrances (Part I): evaluation of comprehensive two-dimensional gas chromatography for quality control, *Flavour Frag J*, 19, 91-98.

Silva A. R., Nogueira J. M. (2010) Stir-bar-sorptive extraction and liquid desorption combined with large-volume injection gas chromatography-mass spectrometry for ultra-trace analysis of musk compounds in environmental water matrices, *Anal Bioanal Chem*, 396, 1853-1862.

Uehara T., Kiyosawa N., Shimizu T., Omura K., Hirode M., Imazawa T., Mizukawa Y., Ono A., Miyagishima T., Nagao T., Urushidani T. (2008) Species-specific differences in coumarin-induced hepatotoxicity as an example toxicogenomics-based approach to assessing risk of toxicity to humans, *Hum Exp Toxicol*, 27, 23-35.

Weisel C.P., Richardson S.D., Nemery B., Aggazzotti G., Baraldi E., Ernest R.B., Blount B.C., Carlsen K.-H., Eggleston P.A., Frimmel F.H., Goodman M., Gordon G., Grinshpun S.A., Heederik D., Kogevinas M., LaKind Judy S., Nieuwenhuijsen M.J., Piper F.C., Sattar S.A. (2009) Childhood Asthma and Environmental Exposures at Swimming Pools: State of the Science and Research Recommendations, *Environ Health Persp*, 117, 500-507.

3. Determinación de fragancias alérgenas por microextracción-emulsificación asistida por ultrasonidos.

3.1 Introducción y resumen

La mayoría de los productos de cuidado personal (PCPs), así como muchos productos de uso doméstico contienen fragancias entre sus ingredientes. El Comité Científico de Productos Cosméticos y Productos no Alimentarios (SCCNFP) ha seleccionado 26 sustancias por producir alergias de contacto (SCCNFP, 1999). En la Unión Europea (UE), estos "alérgenos potenciales" deben estar incluidos en el etiquetado de productos cosméticos y detergentes cuando están presentes en la formulación por encima de una concentración determinada (EU, 2009). Las fragancias pueden provocar un impacto directo sobre la piel, ojos y membranas mucosas, pero también pueden atravesar la piel y absorberse en el cuerpo. El impacto a largo plazo debido a la posible bioacumulación en los tejidos humanos es motivo de preocupación.

Aunque la principal vía de exposición a estos ingredientes cosméticos es, en general, la aplicación directa de productos cosméticos en la piel, el contacto con el agua que contiene estas fragancias debe ser considerado. Un estudio reciente ha analizado la concentración de 15 fragancias alérgenas en el agua de baño de bebés encontrando niveles muy altos para algunos de ellos (Lamas et al., 2009). Estos compuestos también pueden estar presentes en las aguas de uso recreativo y así, la piel puede ser ampliamente expuesta a estos y otros productos químicos a través de estas aguas (WHO, 2010).

Debido a que son componentes importantes de productos de uso diario, las fragancias alérgenas se introducen continuamente en el medio ambiente en grandes cantidades, principalmente a través de los efluentes de aguas residuales urbanas y contribuyen a la contaminación del agua causando preocupación medioambiental.

Aunque se han descrito métodos de análisis para fragancias alérgenas, éstos se han desarrollado para el análisis de cosméticos (Rastogi et al., 1999; Leijts et al., 2005; Niederer et al., 2006; Bassereau et al., 2007; Sgorbini et al., 2010), siendo escasa la información sobre su determinación en agua. Hasta el momento sólo se ha publicado un método para la determinación de 15 fragancias alérgenas potenciales en muestras de agua (Lamas et al., 2009), basado en la microextracción en fase sólida (SPME).

Por otro lado, el uso de ultrasonidos en química analítica, se ha aplicado a matrices sólidas (extracción asistida por ultrasonidos) (Capelo y Mota, 2005; Bossio et al., 2008; Pumure et al., 2010). Recientemente, se ha propuesto una técnica de microextracción en muestras acuosas, conocida como microextracción-emulsificación asistida por ultrasonidos (USAEME) (Regueiro et al., 2008). Esta propuesta se basa en la emulsificación de un microvolumen de extracto orgánico en una muestra acuosa por radiación de ultrasonidos y separación de las dos fases líquidas por centrifugación. La aplicación de radiación ultrasónica acelera el proceso de transferencia de masas entre las dos fases inmiscibles, que junto con la gran superficie de contacto entre ambas fases conduce a un incremento en la eficacia de extracción en un tiempo mínimo. Por lo tanto, la USAEME puede ser empleada como un método simple y eficiente para la extracción y preconcentración de compuestos orgánicos en muestras acuosas. Esta técnica se aplicó por primera vez en la determinación de fragancias de

almizcle sintético, ésteres de ftalato y lindano. Se ha descrito su aplicación exitosa en la determinación de conservantes en aguas (Regueiro et al., 2009), difenil éteres polibromados (Fontana et al., 2009), pesticidas (Ozcan et al., 2009a; Chunhong et al., 2010), bifenilos policlorados (Ozcan et al., 2009b) y 2,4,6-tricloroanisol (Fontana et Altamirano, 2010). También se ha aplicado al análisis inorgánico (Ma et al., 2009).

En este estudio se desarrolló un método basado en la microextracción-emulsificación asistida por ultrasonidos (USAEME) y cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) para el análisis de fragancias alérgicas en agua. Se utilizó un diseño multifactorial para optimizar las condiciones de extracción, como la temperatura de extracción, el disolvente, tiempo de irradiación y el efecto salino. Los compuestos se extrajeron finalmente durante 2 minutos en un medio emulsionado acústicamente formado por 100 μ L de cloroformo y 10 mL de muestra. El proceso de USAEME proporcionó una extracción eficiente y exhaustiva (factor de enriquecimiento de 100); después de la centrifugación, el extracto se analizó por GC-MS.

La validación se realizó con agua ultrapura, así como otras matrices más complejas, tales como aguas residuales. Se obtuvieron recuperaciones entre 75% y 110%, con valores de RSD <10% en la mayoría de los casos. Los límites de detección (LOD) obtenidos estuvieron en el sub-nivel de nanogramo por mililitro.

El procedimiento propuesto se aplicó a la determinación de fragancias en varias muestras reales como agua del grifo, agua de baño de bebés, agua de piscina y de lavadero público y aguas residuales. La presencia de algunos de los compuestos de interés se confirmó en todas las muestras excepto en agua del grifo, lo que demuestra la ubicuidad de

este grupo de ingredientes incluidos en los productos para el cuidado e higiene personal y del hogar.

3.2 Parte experimental

3.2.1 Reactivos, gases y disolventes

El acetato de etilo, acetona y cloroformo (CHCl_3) fueron adquiridos de Merck (Darmstadt, Germany). El 1,1,1-tricloroetano ($\text{C}_2\text{H}_3\text{Cl}_3$) fue obtenido de Sigma (St. Louis, MO, USA) y el tetracloruro de carbono (CCl_4) fue suministrado por Fluka (Buchs, Switzerland). Todos los disolventes fueron de grado analítico. El helio (99.999%) se utilizó como gas portador para GC-MS. En la Tabla 3.1 se muestra la pureza y los proveedores de los estándares de las fragancias.

El estándar interno PCB-30 (2,4,6-triclorobifenilo) fue adquirido como disolución en isooctano ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) de la marca Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). El cloruro de sodio (NaCl) fue adquirido de Merck (Darmstadt, Germany).

Tabla 3.1. Fragancias, pureza y proveedor.

Compuesto	Nombre comercial	Pureza	Proveedor
Linalol	3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol	97%	
Citronelol	3,7-dimetiloct-6-en-1-ol	95%	
Eugenol	2-metoxi-4-prop-2-enil fenol	99%	
Metileugenol	1,2-dimetoxi-4-(2-propenil)-benceno	99%	
Cumarina	2H-1-benzopirán-2-ona	99%	
Farnesol	3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trien-1-ol	95 % (mezcla de isómeros)	Aldrich (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany)
Citral	3,7-dimetilocta-2,6-dienal	95 % (cis/trans)	
Limoneno	1-metil-4-prop-1-en-2-il-ciclohexeno	97%	
Anis alcohol	4-metoxibenceno metanol	98%	
Isoeugenol	2-metoxi-4-(1-propenil) fenol	98 % (cis/trans)	
Cinamato de bencilo	3-fenil fenilmetil ester-2- ácido propenoico	99%	
Amil cinamal	2-(fenilmetileno)-heptanal	97%	
A-isometil ionona	3-metil-4-(2,6,6-trimetil-2-ciclohexen-1-il)-3-buten-2-ona	≥ 85 %	
Geraniol	3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol	≥ 96 %	
Alcohol cinamílico	2-(fenilmetileno)-1-heptanol	≥ 85 %	Fluka (Fluka Chemie GmbH, Steinheim, Germany)
Lilial®	3-(4-tert-butilfenil)-2-metilpropanal	≥95 %	
Lyral®	4-(4-hidroxi-4-metilpentil) ciclohex-3-eno-1-carbaldehído	≥97 %	
Salicilato de bencilo	2-hidroxi-fenilmetil éster ácido benzoico	≥ 99 %	
Octanoato de 2-metilo	ácido 2-Octinoico, metil ester	≥ 99 %	
Hidroxicitronelal	7-hidroxi-3,7-dimetiloctanal	≥ 95 %	
Cinamaldehído	3-fenil-2-propenal	≥ 93 %	SAFC Supply Solutions (St. Louis, USA)
Hexilcinamaldehído	2-(fenilmetileno) octanal	≥95 %	
Alcohol bencílico	metanol benceno	99%	
Cinamil alcohol	3-fenil-2-propen-1-ol	98%	Chem Service (West Chester, USA)
Benzoato de bencilo	fenilmetil benzoato	98.50%	

3.2.2 Patrones

Las disoluciones patrón individuales de cada compuesto se prepararon en acetona y una disolución mezcla de las disoluciones patrón con todos los analitos se preparó en acetona a una concentración final de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Las disoluciones estándar de trabajo se prepararon por dilución a la concentración requerida y se almacenaron en viales ámbar a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.2.3 Muestras

Se analizaron diferentes muestras de agua: agua del grifo, de baño de bebé, piscina y SPA, lavaderos públicos de ropa y estación depuradora de agua residual municipal. El agua de la estación depuradora se filtró a través de un filtro de membrana millipore HA de $0.45 \mu\text{m}$ (Billerica, MA, USA). El exceso de cloro residual en las muestras de agua se eliminó por la adición de tiosulfato de sodio (0.1 mg mL^{-1}). Todas las muestras se almacenaron en recipientes de vidrio a $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.2.4 Procedimiento de USAEME

Se introducen alícuotas de 10 mL de muestra, en tubos de vidrio cónicos para centrífuga de 15 mL. En las condiciones óptimas se adicionan, 2 g de NaCl, $100 \mu\text{L}$ de cloroformo como disolvente extractante y $10 \mu\text{L}$ de una disolución de PCB-30 en hexano de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ como patrón interno. El tubo se sumerge en un baño de ultrasonidos (Selecta, Barcelona), de tal manera que el nivel de ambos líquidos (baño y

muestra) sea el mismo. Las extracciones se realizaron a 40 kHz de frecuencia y 100 W de potencia durante 2 min a 25 ± 3 °C. Como resultado, se forma una emulsión de cloroformo (fase dispersa) en el agua (fase continua). La emulsión se interrumpe por centrifugación a 3400 rpm durante 10 min y la fase orgánica se sedimenta en el fondo del tubo cónico. El cloroformo se retira mediante una jeringa de 100 μ L Hamilton (Reno, Nevada, EE.UU.) y se transfiere a un inserto de vidrio de 100 μ L colocado en un vial de 1.8 mL de cromatografía de gases. Los extractos obtenidos se almacenaron a -20 ° C hasta su análisis por GC-MS.

3.2.5 Limpieza de material y gestión de residuos

La limpieza del material de vidrio así como el procesado de los residuos líquidos se realizó de acuerdo con lo descrito en el capítulo anterior (2.2.5 y 2.2.6).

3.2.6 Análisis cromatográfico y detección

El análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) se realizó en un espectrómetro de masas de trampa iónica Varian 240-MS (Varian Sistemas de cromatografía, Walnut Creek, CA, EE.UU.) con un waveboard para múltiples análisis MS (MS^n), equipado con un inyector automático CP-8400 (Tabla 3.2). El sistema se controla mediante el software Varian MS Workstation v6.9.1.

Tabla 3.2. Condiciones instrumentales empleadas en el GC-MS para la determinación de fragancias alérgicas.

Cromatógrafo de gases VARIAN 450-GC	
Inyector	Split/splitless
Temperatura	260 °C
Modo de inyección	Splitless
Tiempo de splitless	5 min
Flujo de Split	20 mL min ⁻¹
Columna	capilar HP5
Fase estacionaria	(5% fenil, 95% dimetil)polisiloxano
Dimensiones	30 m × 0.25 mm x 0.25 µm
Programa de temperaturas	
Temperatura inicial	45 °C (2 min)
Rampa de temperatura 1	8 °C min ⁻¹ hasta 100 °C
Rampa de temperatura 2	20 °C min ⁻¹ hasta 150 °C
Rampa de temperatura 3	25 °C min ⁻¹ hasta 200 °C (5 min)
Rampa final	8 °C min ⁻¹ hasta 225 °C (1 min)
Tiempo total de análisis	22.5 min
Gas portador	He
Flujo en columna	1.0 mL min ⁻¹ (constante)
Detector: Espectrómetro de masas, trampa de iones VARIAN 240-MS	
Ionización MS	
Modo de ionización	Impacto electrónico (EI, +70 eV)
Modo de adquisición	Full scan
Intervalo de masas	39-400 m/z
Velocidad de barrido	3 µscans
Temperatura interfase	280 °C
Temperatura trampa de iones	150 °C
Temperatura fuente de iones	200 °C
Temperatura manifold	40 °C
Corriente del filamento de emisión	25 µA
Voltaje del multiplicador	1700 V

La Tabla 3.3 resume los tiempos de retención, así como los iones de identificación y cuantificación de las fragancias.

Tabla 3.3. Tiempos de retención, iones de identificación y cuantificación (números en negrita).

Clave	Compuesto	Tiempo de retención (min)	Iones (m/z)
1	Limoneno	8.36	67, 93 , 121
2	Alcohol bencílico	8.72	77, 79, 108
3	Linalol	9.72	43, 93 , 121
4	Octanoato de 2-metilo	10.99	67, 79, 95
5	Citronelol	11.38	69 , 81, 95
6	Citral	11.42, 11.69	39, 69 , 109
7	Geraniol	11.59	41, 69 , 111
8	Cinamaldehído	11.82	77, 103, 131
9	Hidroxicitronelal	11.87	43, 59 , 81
10	Anis alcohol	12.00	77, 109, 138
11	Cinamil alcohol	12.21	77, 92, 134
12	Eugenol	12.43	103, 131, 164
13	Metileugenol	12.71	147, 163, 178
14	Isoeugenol	12.80, 13.09	103, 131, 164
15	Cumarina	13.11	89, 118, 146
16	α -isometil ionona	13.21	107, 135 , 150
17	Lilial [®]	13.54	131, 147, 189
18	Amil cinamal	14.36	115, 129 , 202
19	Lyr [®]	14.54	79, 91, 136
20	Alcohol cinámico	14.73	91, 115, 133
21	Farnesol	14.54	41, 69 , 81
22	Hexilcinamaldehído	15.20, 15.49	115, 129 , 216
23	Benzoato de bencilo	15.52	105 , 194, 212
24	Salicilato de bencilo	16.79	65, 91 , 228
25	Cinamato de bencilo	20.59	91, 131 , 192

3.3 Discusión de Resultados

En la USAEME es necesario considerar la selección adecuada del disolvente de extracción para que se produzca la emulsificación al aplicar ultrasonidos. Algunas de las características necesarias son una densidad superior a la del agua y muy baja solubilidad en ella. Además, debe ser compatible con la técnica de separación y detección y, por tanto, debe mostrar un desarrollo cromatográfico idóneo. La mayoría de los disolventes con densidad superior a la del agua son halogenados. Con base en experiencias previas se evaluó el comportamiento de tetracloruro de carbono, cloroformo, y 1,1,1-tricloroetano. Todos ellos fueron adecuados para el análisis por GC-MS de las fragancias alérgicas y las respuestas obtenidas fueron equivalentes para todos los analitos.

Los primeros experimentos de USAEME se realizaron con alícuotas de 10 mL de agua ultrapura y 100 μ L de disolvente. El tiempo de irradiación de ultrasonidos fue de 10 minutos. En todos los experimentos se usó PCB-30 como estándar interno para minimizar los posibles problemas de falta de repetibilidad en el volumen recuperado de disolvente después de la centrifugación. Con los tres disolventes se observó emulsificación. La fase orgánica se separó por centrifugación y se inyectó en el GC-MS. En la Figura 3.1 se muestra la comparación de las respuestas obtenidas para cada disolvente. En esta figura se observa que las respuestas fueron equivalentes para algunos analitos. Sin embargo, la respuesta fue muy baja para 10 de los analitos con el tetracloruro de carbono, por lo que este disolvente se descartó en la optimización posterior del proceso.

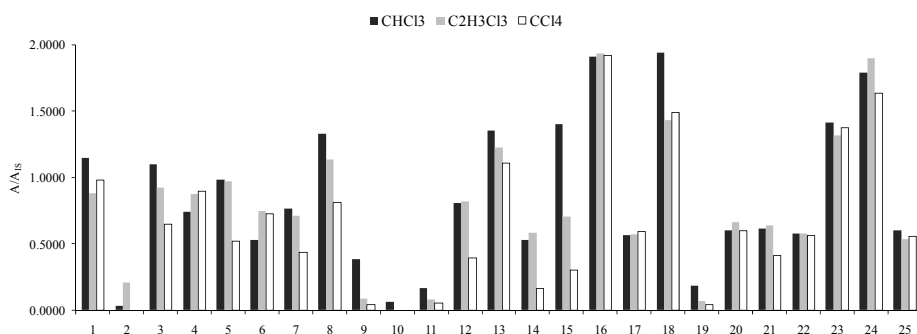


Figura 3.1. Comparación de la respuesta cromatográfica con cloroformo (CHCl₃); 1,1,1-tricloroetano (C₂H₃Cl₃) y tetracloruro de carbono (CCl₄) (clave numérica en Tabla 6.3).

3.3.1 Optimización del proceso: Diseño multifactorial

La influencia de las principales variables que pueden afectar la eficacia la USAEME se evaluó mediante un diseño multifactorial. El estudio consistió en un diseño factorial completo 2^4 , con 16 experimentos aleatorios y 5 grados de libertad para estimar el error experimental. Este diseño tiene una resolución V, lo que significa que es capaz de evaluar todos los efectos principales y todas las interacciones de dos factores.

El análisis numérico de los datos resultantes del diseño experimental se realizó con la herramienta estadística Statgraphics Plus versión 5.1 (Manugistics, Rockville, MD, EE.UU.).

La optimización del diseño factorial se realizó con alícuotas de agua fortificada con los analitos a una concentración de 10 ng mL⁻¹. La selección de un disolvente apropiado es esencial para todos los procesos de extracción líquido-líquido (LLE). El cloroformo y 1,1,1-

tricloroetano, se preseleccionaron en experimentos previos, y se incluyeron en la optimización del diseño experimental, con el objetivo de lograr la mayor eficiencia de extracción de los compuestos. El tiempo de extracción es otro factor importante en la mayoría de los procedimientos de extracción. El efecto de este factor se examinó a dos niveles, 2 y 10 minutos.

La temperatura puede ser también importante, por lo que se incluyó en el estudio de optimización a dos niveles, 25 °C y 50 °C. Por último, el efecto salino frecuentemente se considera en los procedimientos de LLE, SPME y microextracción en fase líquida (LPME). En general, la adición de sal puede disminuir la solubilidad de los analitos en la fase acuosa y promover su transferencia hacia la fase orgánica. Por lo tanto, la concentración de cloruro de sodio en la disolución acuosa fue el último factor evaluado considerándose a dos niveles: 0% (sin adición) y el 20% (m/V).

En resumen, se seleccionaron cuatro variables en este diseño: tiempo de extracción (A), disolvente (B), temperatura (C), y concentración de cloruro de sodio (D). En la Tabla 3.4 se resumen los parámetros del diseño experimental.

Tabla 3.4. Parámetros considerados en el diseño multifactorial.

Factor	Clave	Nivel bajo (-)	Nivel alto (+)
Tiempo (min)	A	2	10
Disolvente	B	cloroformo	tricloroetano
Temperatura (°C)	C	25	50
Adición de NaCl (%)	D	0	20

El análisis numérico de los resultados se presenta como análisis de varianza (ANOVA) en la Tabla 3.5. Sólo los factores de interacción que fueron significativos están incluidos. Se observa que los factores más importantes, con significación estadística para muchos de los compuestos, son el disolvente de extracción (B) y la concentración de cloruro de sodio (D). La temperatura (C) y el tiempo de extracción (A), en general, fueron factores no significativos, con algunas excepciones.

Por lo que respecta a la interacción de dos factores, el único efecto importante es el que existe entre el disolvente y la concentración de cloruro de sodio (BD), que fue estadísticamente significativo para diez compuestos.

Tabla 3.5. Relaciones *F* y valores de *p* obtenidos en el análisis de varianza.

Compuesto	Efectos principales												Interacciones					
	A: tiempo		B: disolvente		C: temperatura		D: % NaCl		BC		BD							
	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>						
Limoneno	22	+	9	+	11	+	271	+	0.2			8	+					
Alcohol bencílico	0		84	+	4		84	+	4			84	+					
Linalol	2		1		1		43	+	2			0						
Octanoato de 2-metilo	0.03		35	+	5		4		1			18	+					
Citronelol	2		6		0.5		3		0			0.2						
Citral	0.1		80	+	2		7	+	5			24	+					
Geraniol	5		84	+	2		48	+	1			0.1						
Cinamaldehído	0.3		19	+	23	+	126	+	0.01			1						
Hidroxicitronelal	0.3		479	+	0.2		1016	+	5			15	+					
Anis alcohol	1		259	+	3		203	+	3			155	+					
Cinamil alcohol	0.5		491	+	4		1068	+	10	+		123	+					
Eugenol	0.4		8	+	31	+	65	+	0.1			3						
Metil Eugenol	0.5		3		4		1		0.01			0.1						
Isoeugenol	17	+	17	+	2		21	+	16	+		1						
Cumarina	0.3		533	+	97	+	262	+	21	+		0.4						
α-isometil ionona	5		83	+	6		1		1			30	+					
Lilial®	0.3		3		0.3		0.01		0.4			3						
Amil cinamal	0.3		5		0.1		6		0.01			0.3						
Lyrál®	2		320	+	10	+	275	+	5			35	+					
Alcohol cinamílico	2		0.2		2		3		5			10	+					
Farnesol	11	+	0.4		0.1		0.2		0.3			1						
Hexicinamaldehído	1		0.4		14	+	7	+	0			3						
Benzoato de bencilo	0		2		0.1		3		0.1			3						
Salicilato de bencilo	0		27	+	0.1		2		0.03			2						
Cinamato de bencilo	0.1		3		0.4		9	+	0.2			0.3						

+ , *p* < 0.05; celda vacía, *p* > 0.05.

La información incluida en el análisis de varianza se puede representar gráficamente por medio de los diagramas de Pareto. En la Figura 3.2, se presentan algunos gráficos representativos. En estos gráficos la longitud de cada barra es proporcional al valor absoluto de su efecto normalizado. El efecto normalizado se obtiene dividiendo el efecto estimado de cada factor o interacción por su error estándar. La línea vertical en los gráficos representa el límite estadísticamente significativo al nivel de confianza del 95%.

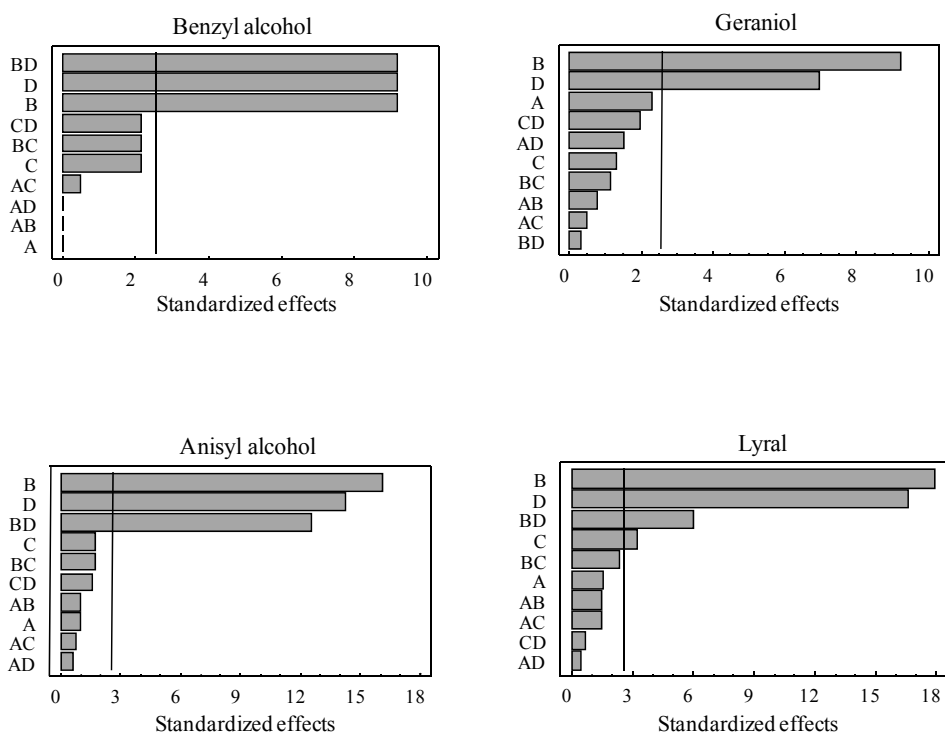


Figura 3.2. Diagramas de Pareto que muestran los factores significativos (95%) para algunas fragancias alérgicas (consultar claves de factores en la Tabla 3.4).

Los efectos principales también se pueden representar mediante gráficos. En la Figura 3.3 se muestra los diagramas de los efectos principales de varias fragancias alérgicas. Este tipo de gráficos muestran los efectos principales con una línea trazada entre el nivel bajo y alto de los correspondientes factores. La longitud de las líneas es proporcional a la magnitud del efecto de cada factor en el proceso de extracción, y el signo de la pendiente indica el nivel del factor que produce la respuesta máxima.

El disolvente y la concentración de cloruro de sodio fueron los factores más importantes y su influencia se aprecia claramente en los gráficos. Para la mayoría de los compuestos la mayor eficacia de extracción se observó con el cloroformo, aunque la extracción con 1,1,1-tricloroetano, fue más favorable para seis analitos, como el citral (Figura 3.3). En general, la adición de NaCl afecta positivamente a la extracción de los analitos (ver algunos ejemplos en la figura), a excepción del limoneno, hexilcinamaldehído y cinamato de bencilo. En cuanto a la temperatura y el tiempo de extracción, estos factores no fueron significativos, con algunas excepciones (50 °C para el alcohol bencílico; 10 minutos para el Lyrat[®]). Para la mayoría de los analitos la mejor extracción se obtuvo a 25 °C y 2 min.

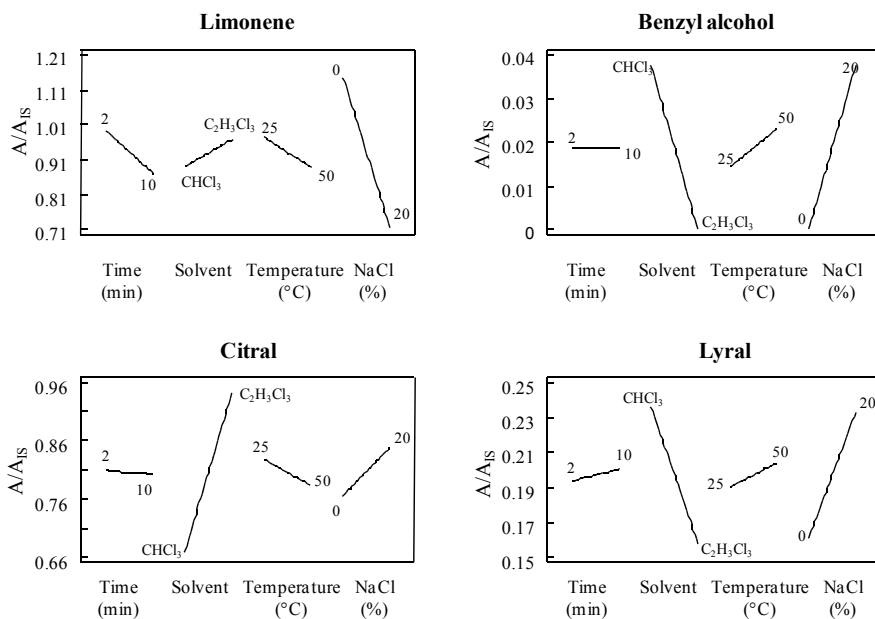


Figura 3.3. Efectos principales para algunas fragancias alérgicas.

La interacción de los factores principales, disolvente y adición de sal, también fue significativa para varios analitos, siendo incluso el factor más importante en algunos casos, por ejemplo para el alcohol bencílico (Figura 3.2). Esta interacción se muestra en la Figura 3.4 para algunos analitos. En ella se aprecia cómo la adición de sal favorece la extracción con cloroformo, pero no beneficia la extracción con 1,1,1-tricloroetano.

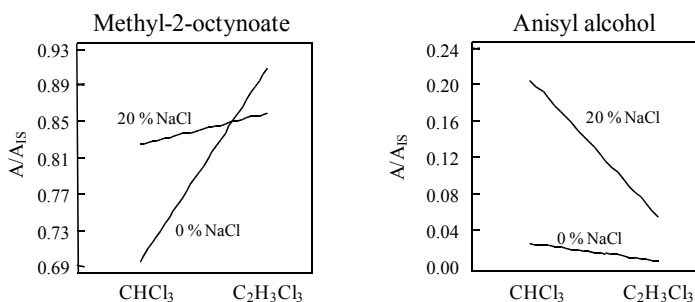


Figura 3.4. Interacción de efectos para octanoato de 2-metilo y anís alcohol

En base a los resultados del diseño experimental, las condiciones generales seleccionadas para la microextracción-emulsificación asistida por ultrasonidos simultánea de las fragancias alérgicas a partir de muestras de agua, fueron las siguientes: tiempo de extracción de 2 minutos, cloroformo como extractante, 20% de cloruro de sodio y 25 °C.

3.3.2 Parámetros analíticos de calidad del método

Debido a la ubicuidad de los compuestos estudiados ya que se utilizan en todo tipo de productos de limpieza y cosméticos, el riesgo de contaminación de la muestra es significativo. Se recomienda extremar las precauciones para evitar las fuentes de interferencia en el entorno del laboratorio. Los blancos se deben hacer frecuentemente para garantizar la ausencia de contaminación.

Se determinaron los parámetros analíticos de calidad con el fin de evaluar la idoneidad del método de USAEME. La linealidad del método se comprobó mediante la inyección de disoluciones estándar en cloroformo a concentraciones entre 0.020 µg mL⁻¹ y 10 µg mL⁻¹. Se

obtuvieron coeficientes de determinación (R^2) entre 0.9974 y 1.0000 para todos los compuestos (Tabla 3.6).

Las recuperaciones se evaluaron en agua milliQ fortificadas a concentraciones de entre 0.5 ng mL^{-1} y 100 ng mL^{-1} . Se calcularon dividiendo la diferencia entre las concentraciones medidas en las muestras fortificadas y no fortificadas entre las concentraciones de los compuestos agregados. Los valores obtenidos pueden considerarse satisfactorios, generalmente entre el 70% y el 110%, con excepción de tres de los 25 analitos, limoneno, alcohol bencílico y anís alcohol. Para estos últimos compuestos, las recuperaciones fueron muy bajas, con valores promedio de 18%, 20% y 27% respectivamente (Tabla 3.6).

La precisión del procedimiento experimental se evaluó también a varios niveles de concentración, mediante el cálculo de la desviación estándar relativa (RSD). Los resultados también se muestran en la Tabla 3.6, y fueron inferiores al 10% en la mayoría de los casos. También se muestran los límites de detección LODs (relación señal/ruido de 3) del procedimiento completo, todos ellos estuvieron por debajo de 1 ng mL^{-1} , con excepción del anís alcohol.

Uno de los objetivos de este trabajo de Tesis fue desarrollar una metodología adecuada para el análisis de compuestos de interés en diferentes tipos de muestras de agua y, en consecuencia, fue necesario evaluar los posibles efectos de la matriz. Las muestras de la estación depuradora de aguas residuales (EDAR) y agua de baño de bebé (ABB), fueron fortificadas con los compuestos de interés a diferentes concentraciones, y luego analizadas por el método propuesto. Como se puede observar en las dos últimas columnas de la Tabla 3.6, las recuperaciones fueron satisfactorias para todos los compuestos, con excepción de los tres mismos compuestos con baja recuperación en

agua milliQ. Estas bajas recuperaciones fueron consistentes en todas las muestras, y también en concordancia con las obtenidas a partir de agua ultrapura. Por lo tanto, el método puede considerarse adecuado para la determinación de 22 de los compuestos de interés en muestras reales. La concentración de los otros tres compuestos, limoneno, el alcohol bencílico, anís alcohol, podría estimarse con la introducción de un factor de corrección, aunque estas concentraciones sólo se consideran como valores estimativos.

Tabla 3.6. Linealidad, límites de detección (LODs) y recuperación del método USAEME.

Compuesto	Linealidad R ²	LOD (ng mL ⁻¹)	Recuperaciones (RSD)%					100 ng mL ^{-1b}	ABB ^c (10 ng mL ⁻¹)	EDAR ^c (2 ng mL ⁻¹)
			0.5 ng mL ^{-1a}	2 ng mL ^{-1a}	10 ng mL ^{-1a}	100 ng mL ^{-1a}	ABB ^c (10 ng mL ⁻¹)			
Limoneno	0.9986	0.30	25.0 (8.5)	19.0 (6.4)	16.1 (10)	18.2	9.0 (10)	19.9 (3.5)		
Alcohol bencílico	0.9995	0.95	113 (8.1)	89.1 (6.0)	95.4 (2.3)	91.3	87.9 (8.3)	96.3 (1.6)		
Linalol	0.9999	0.04	79.2 (6.8)	81.6 (0.2)	88.7 (4.5)	81.7	81.7 (4.5)	81.8 (10)		
Octanoato de 2-metilo	0.9998	0.06	88.0 (10)	95.6 (6.1)	96.9 (6.5)	85.8	108 (13)	96.4 (3.6)		
Citronelol	0.9997	0.28	88.5 (1.1)	71.8 (2.7)	70.5 (6.9)	63.1	81.4 (3.7)	73.1 (7.0)		
Citral	0.9994	0.06	88.0 (10)	95.6 (6.1)	96.9 (6.5)	85.8	108 (13)	96.4 (3.6)		
Geraniol	0.9993	0.45	84.2 (1.9)	84.2 (1.9)	95.8 (2.9)	84.7	79.2 (2.9)	91.4 (4.7)		
Cinamaldehído	0.9999	0.02	99.8 (6.9)	88.7 (5.9)	90.6 (3.7)	81.2	114 (3.1)	88.2 (8.0)		
Hidroxicitronelal	0.9999	0.05	88.5 (1.1)	71.8 (2.7)	70.5 (6.9)	63.1	81.4 (3.7)	73.1 (7.0)		
Anis alcohol	0.9981	1.15	105 (6.4)	96.5 (6.6)	96.4 (3.0)	85.1	109 (3.9)	98.6 (5.8)		
Cinamil alcohol	0.9974	0.25	105 (6.4)	96.5 (6.6)	96.4 (3.0)	85.1	109 (3.9)	98.6 (5.8)		
Eugenol	0.9998	0.01	105 (6.4)	96.5 (6.6)	96.4 (3.0)	85.1	109 (3.9)	98.6 (5.8)		
Metileugenol	0.9999	0.01	105 (6.4)	96.5 (6.6)	96.4 (3.0)	85.1	109 (3.9)	98.6 (5.8)		
Isoeugenol	0.9987	0.04	78.0 (8.6)	83.5 (12)	92.6 (5.8)	83.5	82.6 (3.0)	85.5 (9.5)		
Cumarina	0.9996	0.01	96.5 (3.6)	86.3 (6.4)	86.6 (4.8)	75.2	98.7 (11)	83.3 (2.1)		
α-isometil ionona	0.9998	0.01	85.2 (6.7)	77.2 (1.2)	83.3 (7.0)	77.9	90.0 (5.6)	75.4 (0.9)		
Lilial®	0.9997	0.01	112 (6.7)	89.9 (5.7)	90.2 (7.2)	86.6	88.8 (7.0)	79.5 (1.9)		
Amil cinamal	0.9999	0.02	102 (7.4)	75.3 (14)	85.7 (3.9)	80.3	72.9 (7.3)	79.1 (4.2)		
Lyral®	0.9999	0.06	91.8 (8.9)	76.2 (3.1)	75.4 (11)	69.7	89.2 (5.9)	89.9 (0.5)		
Alcohol cinamílico	0.9999	0.28	96.2 (15)	106 (3.4)	106 (3.4)	84.8	116 (4.8)	108 (6.4)		
Farnesol	0.9999	0.55	81.5 (9.0)	81.8 (7.5)	81.7	113 (9.1)	86.7 (7.2)	86.7 (7.2)		
Hexicinamaldehído	0.9999	0.03	79.8 (8.8)	72.0 (0.8)	76.6 (3.8)	77	70.0 (6.5)	69.7 (11)		
Benzoato de bencilo	0.9996	0.01	89.0 (10)	86.8 (4.5)	92.5 (6.8)	83.2	96.3 (3.9)	92.4 (4.5)		
Salicilato de bencilo	1	0.01	95.0 (7.6)	97.5 (1.4)	95.2 (6.3)	85.8	95.3 (4.5)	106 (4.1)		
Cinamato de bencilo	0.9993	0.02	70.3 (6.1)	91.0 (2.0)	85.8 (9.2)	78.1	89.4 (5.3)	90.4 (9.2)		

^a n = 4. ^b n = 2. ^c n = 3.

3.3.3 Análisis de muestras reales

El método propuesto se aplicó al análisis de varias muestras de agua, que incluyen agua de grifo, agua de baño de bebé, piscina y SPA de aromaterapia, agua de lavaderos públicos de ropa y agua de una estación depuradora de aguas residuales. La presencia de algunos de los compuestos de interés se confirmó en todas las muestras (Tabla 3.7). En el caso de las muestras de agua de baño de bebé (ABB), el uso de productos tales como champús, espumas de baño y jabones hidratantes que contengan perfumes, es la causa de los altos niveles que se encuentran de algunos de los analitos. Las muestras de lavaderos públicos (LPR), también contenían algunas fragancias alérgicas. Estas muestras fueron tomadas en horas de la tarde, en el colector de salida que directamente descarga las aguas a un río. En este caso, la presencia de algunos de los alérgenos del estudio se debe a la utilización de productos de limpieza para ropa. Aunque el número y la concentración de compuestos que se encontraron en la piscina cubierta de invierno (PCI) y la estación depuradora de aguas residuales (EDAR) no fue muy alta, la aparición de fragancias alérgicas demuestra la ubicuidad de estos ingredientes. También, se incluyó una muestra obtenida de un SPA de aromaterapia (SPAA) que contiene altos niveles de algunas de las fragancias alérgicas.

Tabla 3.7. Presencia de fragancias alérgicas en diferentes tipos de agua (ng mL⁻¹).

Compuesto	ABB1	ABB2	ABB3	ABB4	ABB5	ABB6	ABB7	ABB8	ABB9	ABB10	ABB11	ABB12	ABB13	LPR1	LPR2	LPR3	PC1	PC2	PC3	PC14	SPAA	EDAR	
Limoneno ^a	0.620	2.64	128	0.380	4.78	1.15	2.22	7.75	4.23	5.95	3.37	7.75	18.9		0.550	0.765						4.98	
Linalol		19.9	76.3	23	9.57	87.4	2.74	2.83	3385	4.15	26.1	30.2	204										0.251
Alcohol bencílico ^a	6.55			3.95																			
Citronelol	91.8	7.59		5.23	1.69	4.29			1.82			51.1			0.987								
Citral									2.11			5.33					0.190						
Geraniol	23.4	9.25					11.5	2.5	2.18	5.67		11.4	21.6										
Hidroxicitronelal				4.66								0.444	0.721										
Cinamil alcohol														1.02									
Eugenol	1.77			6.02	0.225				0.829	0.706		4.25	6.93		0.093	0.017		0.180					3.75
Metil eugenol																							0.146
α-isometil ionona		2.48			4.39																		0.121
Isoeugenol																							
Lilial [®]	0.133	0.462		0.040	0.462		0.385	0.378				0.759	0.417	0.04	0.052	0.053	0.630	0.133	0.183	0.165			0.995
Lyral [®]																							0.407
Cumarina	0.200	23.2	0.500	0.046	11.5	0.990			0.232			43.4	0.148										
Hexilcinamaldehído			1.13		0.364	2.13							0.34				0.090			0.101			>LOD
Benzoato de bencilo	0.086	2.08	0.364		0.861							8.94	0.247		0.177	>LOD	0.093	0.215	0.077	0.058			
Salicilato de bencilo		0.840		0.089	0.894	0.233	0.979	0.300				0.289	0.556										0.092
Cinamato de bencilo																							2.7

Los espacios en blanco indican valores medios por debajo de LOD

^a Los valores fueron corregidos teniendo en cuenta la eficiencia de extracción promedio

Bibliografía

Bassereau M., Chaintreau A., Duperrex S., Joulain D., Leijts H., Loesing G., Owen N., Sherlock A., Schippa C., Thorel P.J., Vey M. (2007) GC-MS quantification of suspected volatile allergens in fragrances. 2. Data treatment strategies and method performances, *J Agric Food Chem*, 55, 25-31.

Bossio J.P., Harry J., Kinney C.A. (2008) Application of ultrasonic assisted extraction of chemically diverse organic compounds from soils and sediments, *Chemosphere*, 70, 858-864.

Capelo J.L., Mota A.M. (2005) Ultrasonication for analytical chemistry, *Cur Anal Chem*, 1, 193-201.

Chunhong J., Xiaodan Z., Li C., Min H., Pingzhong Y., Ercheng Z. (2010) Extraction of organophosphorus pesticides in water and juice using ultrasound-assisted emulsification-microextraction, *J Sep Sci*, 33, 244-250.

EU (2009) Regulation (EC) No. 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on Cosmetic Products (recast). *Official Journal of European Union*, 59.

Fontana A.R., Altamirano J.C. (2010) Sensitive determination of 2,4,6-trichloroanisole in water samples by ultrasound assisted emulsification microextraction prior to gas chromatography-tandem mass spectrometry analysis, *Talanta*, 81, 1536-1541.

Fontana A.R., Wuilloud R.G., Martínez L.D., Altamirano J.C. (2009) Simple approach based on ultrasound-assisted emulsification-microextraction for determination of polibrominated flame retardants in water samples by gas chromatography-mass spectrometry, *J Chromatogr A*, 1216, 147-153.

IFRA International Fragrance Association.
<<http://www.ifraorg.org/Home/page.aspx/3>> (consultado junio 2010).

Lamas J.P., Sanchez-Prado L., Garcia-Jares C., Llompart M. (2010) Determination of fragrance allergens in indoor air by active sampling followed by ultrasound-assisted solvent extraction and gas chromatography-mass spectrometry, *J Chromatogr A*, 1217, 1882-1890.

Lamas J.P., Sanchez-Prado L., Garcia-Jares C., Llompart M. (2009) Solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry determination of fragrance allergens in baby bathwater, *Anal Bioanal Chem*, 394, 1399-1411.

Leijts H., Broekhans J., van Pelt L., Mussinan C. (2005) Quantitative analysis of the 26 allergens for cosmetic labeling in fragrance raw materials and perfume oils, *J Agric Food Chem*, 53, 5487–5491.

Ma J.J., Du X., Zhang J.W., Li J.C., Wang L.Z. (2009) Ultrasound-assisted emulsification–microextraction combined with flame atomic absorption spectrometry for determination of trace cadmium in water samples, *Talanta*, 80, 980–984.

Niederer M., Bollhalder R., Hohl C. (2006) Determination of fragrance allergens in cosmetics by size-exclusion chromatography followed by gas chromatography-mass spectrometry, *J Chromatogr A*, 1132, 109–116.

Ozcan S., Tor A., Aydin M.E. (2009a) Application of ultrasound-assisted emulsification–micro-extraction for the analysis of organochlorine pesticides in waters, *Water Res*, 43, 4269–4277.

Ozcan S., Tor A., Aydin M.E. (2009b) Determination of selected polychlorinated biphenyls in water samples by ultrasound-assisted emulsification–microextraction and gas chromatography-mass-selective detection, *Anal Chim Acta*, 647, 182–188.

Pumure I., Renton J.J., Smart R.B. (2010) Ultrasonic extraction of arsenic and selenium from rocks associated with mountaintop removal/valley fills coal mining: estimation of bioaccessible concentrations, *Chemosphere*, 78, 1295–1300.

Rastogi S.C., Johansen J.D., Menné T., Frosch P., Bruze M., Andersen K.E., Lepoittevin J.P., Wakelin S., White I.R. (1999) Contents of fragrance allergens in children's cosmetics and cosmetic-toys, *Contact Dermatitis*, 41, 84–88.

Regueiro J., Llompart M., Garcia-Jares C., Garcia-Monteagudo J.C., Cela R. (2008) Ultrasound-assisted emulsification–microextraction of emergent contaminants and pesticides in environmental waters, *J Chromatogr A*, 1190, 27–38.

Regueiro J., Llompart M., Psillakis E., Garcia-Monteagudo J.C., Garcia-Jares C. (2009) Ultrasound-assisted emulsification–microextraction of phenolic preservatives in water, *Talanta*, 79, 1387–1397.

SCCNFP (1999), SCCNFP/0017/98 (1999) Final Fragrance Allergy in Consumers Brussels.

Sgorbini B., Ruosi M.R., Cordero C., Liberto E., Rubiolo P., Bicchi C. (2010) Quantitative determination of some volatile suspected allergens in cosmetic creams spread on skin by direct contact sorptive tape extraction-gas chromatography–mass spectrometry, *J Chromatogr A*, 1217, 2599–2605.

WHO (2010) Guidelines for Safe Recreational Water Environments. vol. 2. Swimming Pools and Similar Environments. World Health Organization.
<http://www.who.int/water_sanitation_health/bathing/bathing2/en/>.
(consultada junio 2010).

4. Microextracción-emulsificación asistida por ultrasonidos para el análisis de compuestos químicos de alto volumen de producción en muestras de agua.

4.1 Introducción y resumen

Los métodos analíticos desarrollados para los compuestos de elevado volumen de producción propuestos en este trabajo de Tesis son escasos. Algunos de estos compuestos se han incluido en estudios para determinar pesticidas en agua (butóxido de piperonilo y 2-fenilfenol) o en el análisis de problemas de corrosión (benzotiazol). La mayoría de los métodos se basan en las técnicas de extracción líquido-líquido (Gomez et al., 2009) y en la extracción en fase sólida (SPE) (Rodil et al., 2011) que requieren volúmenes grandes de muestra. También se ha descrito el uso de la microextracción en fase sólida (Casas et al., 2007).

Por primera vez, se propone un método basado en la microextracción líquido-líquido asistida por ultrasonidos para investigar la incidencia de estos contaminantes en aguas.

La técnica de microextracción-emulsificación asistida por ultrasonidos (USAEME) ha sido propuesta por Regueiro y colaboradores (Regueiro et al., 2008), y se basa en la emulsificación de microvolúmenes de extractantes orgánicos en una muestra acuosa por radiación ultrasónica y separación de ambas fases líquidas por centrifugación. La aplicación de la radiación ultrasónica acelera el proceso de transferencia de masa entre las dos fases inmiscibles, que junto con la gran superficie de contacto entre ambas fases, conduce a un incremento en la eficacia de extracción en un tiempo mínimo. Después de su introducción en 2008,

la técnica de USAEME se ha aplicado exitosamente a diversas clases de compuestos orgánicos (Regueiro et al., 2009; Fontana et al., 2009; Ozcan et al., 2009; Chunhong et al., 2010; Cabaleiro et al., 2011).

En este trabajo se desarrolló un método analítico con derivatización *in-situ* mediante microextracción-emulsificación asistida por ultrasonidos (USAEME) y determinación por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) para el análisis de benzotiazol (BTZ), 4-*tert*-butilfenol (TBP), 2-fenilfenol (PP) y butóxido de piperonilo (PBO) en aguas. Estos compuestos se caracterizan por un alto volumen de producción y uso generalizado en muchos productos, insecticidas e intermediarios de procesos químicos.

Las condiciones de extracción que incluyen la acetilación *in-situ* de los fenoles, se optimizaron mediante un diseño experimental. En el procedimiento propuesto, los compuestos se extrajeron durante 5 minutos en un medio emulsificado acústicamente a partir de 200 μL de cloroformo y 10 mL de muestra. El proceso mediante USAEME con derivatización proporciona una extracción eficiente y exhaustiva con la ventaja adicional de que después de la centrifugación, el extracto está listo para su análisis por GC-MS y GC-MS/MS.

La validación del método se realizó con muestras de agua. Se obtuvieron recuperaciones de entre 68 y 111 %, la precisión determinada por la desviación estándar relativa (RSD) fue $\leq 10\%$. Los límites de cuantificación (LOQs) fueron del orden de sub-ng por mililitro (0.012-0.072 ng mL^{-1}). El procedimiento se aplicó para la determinación de los compuestos de interés en diferentes muestras de agua que incluyen influente y efluente de estaciones depuradoras de agua residual, confirmándose su presencia en ellas.

Adicionalmente, y ya que la cloración es el método más común de desinfección del agua, se han realizado experimentos para establecer el comportamiento de los compuestos estudiados en relación con la cloración. Se demuestra por primera vez, que la presencia de cloro como agente desinfectante en el agua no afecta al benzotiazol ni al butóxido de piperonilo, que se mantuvieron estables incluso a concentraciones de hasta 4 mg L^{-1} de cloro, mientras que los compuestos fenólicos (TBP y PP) incluso a niveles más bajos de cloración se transformaron en varios derivados mono- y di-clorados.

4.2 Parte experimental

4.2.1 Reactivos, gases y disolventes

El acetato de etilo, acetona, cloroformo (CHCl_3), 1,1,1-tricloroetano ($\text{C}_2\text{H}_3\text{Cl}_3$), anhídrido acético, piridina, la disolución de hipoclorito de sodio (grado reactivo, 4% de cloro disponible) y el cloruro de sodio se adquirieron de Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany). El hidrógeno fosfato de sodio heptahidratado y el tiosulfato de sodio se obtuvieron en Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany). Todos los reactivos y disolventes fueron de grado analítico. Se utilizó Helio (99.999%) como gas portador para GC.

En la Tabla 4.1 se muestran los proveedores de los compuestos de alto volumen de producción.

Tabla 4.1. Proveedores de los compuestos de alto volumen de producción.

Compuesto	Proveedor
Benzotiazol (BTZ)	Aldrich (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany)
4- <i>tert</i> -butilfenol (TBP)	Fluka (Fluka Chemie GmbH, Steinheim, Germany)
2-Hidroxibifenil (2-fenilfenol, PP)	Riedel-de-Haen (Seelze, Germany)
5-[2-(2-butoxi)etoximetil]-6-propil-1,3-benzodioxol (butóxido de piperonilo, PBO)	

El estándar interno PCB-30 (2,4,6-triclorobifenilo) se adquirió de Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany).

4.2.2 Patrones

Las disoluciones patrón individuales de cada compuesto se prepararon en acetona; una disolución mezcla de las disoluciones patrón con todos los analitos se preparó en acetona con una concentración de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Las disoluciones estándar de trabajo se prepararon por dilución a la concentración requerida y se almacenaron a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ en viales ámbar.

4.2.3 Muestras

Se analizaron diferentes muestras de agua de estaciones depuradoras de agua residual municipal. El agua de las estaciones depuradoras se filtró a través de un filtro de membrana millipore HA de $0.45 \mu\text{m}$ (Billerica, MA, USA). El exceso de cloro residual en las muestras de

agua se eliminó por la adición de tiosulfato de sodio (0.1 mg mL^{-1}). Todas las muestras se almacenaron en recipientes de vidrio a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2.4 Procedimiento de USAEME con derivatización *in-situ*

Para la aplicación simultánea de la USAEME y derivatización, se introducen alícuotas de 10 mL de muestra en tubos cónicos para centrifuga de 15 mL, en los que previamente se ha pesado hidrógeno fosfato de sodio (0.1 g). En las condiciones óptimas se adicionan 200 μL de cloroformo como disolvente extractante y 10 μL de una disolución de $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ de PCB-30 en acetona (patrón interno) y 200 μL de anhídrido acético (agente derivatizante). El tubo se sumerge en un baño de ultrasonidos (Selecta, Barcelona), de tal manera que el nivel de ambos líquidos (baño y muestra) sea el mismo. Las extracciones se realizaron a 40 kHz de frecuencia y 110 W de potencia durante 5 min. Como resultado, se forma una emulsión de cloroformo (fase dispersa) en agua (fase continua). La emulsión se interrumpe por centrifugación (centrifuga Rotofix 32, Hettich, Alemania) a 3700 rpm durante 10 min y la fase orgánica se sedimenta en el fondo del tubo cónico. El cloroformo se retira mediante una jeringa de 100 μL Hamilton (Reno, Nevada, EE.UU.) y se transfiere a un inserto de vidrio colocado en un vial de 1.8 mL de cromatografía de gases. Los extractos obtenidos se almacenaron a $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis cromatográfico.

La cuantificación se llevó a cabo utilizando disoluciones estándar derivatizadas de los analitos en cloroformo. En este caso la acetilación se llevó a cabo mediante la adición de 100 μL de anhídrido acético con 2.5% de piridina a 1 mL de disolución estándar. La mezcla se mantiene a $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos y se deja enfriar a temperatura ambiente para su análisis.

4.2.5 Cloración

Los experimentos de cloración se realizaron utilizando disoluciones de agua con hipoclorito de sodio. Estas disoluciones fueron fortificadas con la mezcla estándar de analitos para obtener una concentración de 10 ng mL^{-1} . Después del tiempo de reacción, el exceso de cloro libre se eliminó con tiosulfato de sodio (0.1 mg mL^{-1}) y la USAEME se realizó como se ha descrito anteriormente. En estos experimentos no se adicionaron los reactivos derivatizantes para evitar posibles reacciones secundarias.

4.2.6 Limpieza de material y gestión de residuos.

La limpieza del material de vidrio así como el procesado de los residuos líquidos se realizó de acuerdo con lo descrito en el apartado III.2 (2.2.5 y 2.2.6).

4.2.7 Análisis cromatográfico y detección

En la Tabla 4.2 se detallan las condiciones instrumentales empleadas para la determinación de los compuestos de alto volumen de producción estudiados en este trabajo. Los iones precursores se seleccionaron entre los iones característicos más intensos del espectro de masas, dando lugar a las transiciones MS/MS más eficientes en la trampa de iones. Siempre que fue posible, se seleccionaron dos o tres iones producto por compuesto para la identificación inequívoca de los analitos. Las condiciones específicas de MS/MS y los tiempos de retención para cada compuesto de interés se muestran en la Tabla 4.3.

Tabla 4.2. Condiciones instrumentales empleadas.

GC-MS/MS Polaris Q (Thermo Fisher Scientific)	
Inyector PTV	Split/splitless
Temperatura inicial	40 °C
Modo de inyección	Splitless
Rampa de temperatura	14.5 °C s ⁻¹ (9 min)
Tiempo de splitless	1.3 min
Temperatura final	220 °C
Columna	Thermo TR-5ms
Fase estacionaria	(5% fenil, 95% dimetil)polisiloxano
Dimensiones	30 m × 0.25 mm x 0.25 µm
Programa de temperaturas	
Temperatura inicial	80 °C (1 min)
Rampa de temperatura	10 °C min ⁻¹ hasta 280 °C (5 min)
Gas portador	He
Flujo en columna	1.0 mL min ⁻¹ (constante)
Detector: Espectrómetro de masas, Thermo Fisher Scientific	
Ionización MS	
Modo de ionización	Impacto electrónico (EI, +70 eV)
Modo de adquisición	SIM (Selected Ion Monitoring)
Temperatura interfase	280 °C
Temperatura fuente de iones	230 °C
Flujo de gas de amortiguamiento en la trampa de iones	0.9 ml min ⁻¹

Tabla 4.3. Condiciones del método de GC-MS/MS para cada compuesto.

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Ión Precursor (m/z)	Energía de colisión (V)	q	Iones de identificación y cuantificación (m/z)
Benzotiazol (BTZ)	6.92	135.1	1.3	0.225	84.1 + 91.1 + 108.1 + 135.1
4- <i>tert</i> -Butilfenol(TBP)	8.93	135.1	1	0.225	95.2 + 107.1 + 135.1
2-fenilfenol (PP)	11.73	170.1	1.2	0.225	142.2 + 170.1
Butóxido de Piperonilo (PBO)	19.31	176.1	1.1	0.225	118.1 + 146.1 + 161.1 + 176.1
PCB-30 (IS)	13.33	186.1	1.4	0.3	151.2 + 186.1

En alguno de los experimentos de extracción y de cloración se utilizó un equipo de cromatografía Agilent 7890A acoplado a un detector selectivo de masas cuadrupolar con un automuestreador 7693 Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) (Tabla 4.4). El sistema se controla mediante el software Agilent MSD ChemStation E.02.00.493. El volumen de inyección fue de 1 μL .

Tabla 4.4. Condiciones instrumentales empleadas en el cromatógrafo Agilent.

Cromatógrafo de gases Agilent 7890A	
Columna	capilar HP5
Fase estacionaria	(5% fenil, 95% dimetil)polisiloxano
Dimensiones	30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm
Programa de temperaturas	
Temperatura inicial	80 $^{\circ}\text{C}$ (2 min)
Rampa de temperatura	10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ hasta 280 $^{\circ}\text{C}$ (3 min)
Tiempo total de análisis	25 min
Gas portador	He
Flujo en columna	1.0 mL min^{-1} (constante)
Detector selectivo de masas, triple cuadrupolo Agilent 5975C	
Ionización MS	
Modo de ionización	Impacto electrónico (EI, +70 eV)
Modo de adquisición	Full scan
Intervalo de masas	40-500 m/z
Temperatura interfase	290 $^{\circ}\text{C}$
Temperatura cuadrupolo	150 $^{\circ}\text{C}$
Temperatura fuente de iones	230 $^{\circ}\text{C}$
Voltaje del multiplicador	1200 V

4.3 Optimización del proceso

Los parámetros que influyen potencialmente en la eficacia del procedimiento analítico se estudiaron utilizando un diseño experimental. Se seleccionaron el tipo de disolvente de extracción, la adición de reactivos derivatizantes, el tiempo de aplicación de ultrasonidos y el efecto salino. La selección de un extractante apropiado es un parámetro importante para los procesos de USAEME. Partiendo de la base de estudios previos (Regueiro et al., 2008 et Becerril-Bravo et al., 2010) se incluyeron el cloroformo y el 1,1,1-tricloroetano en el diseño experimental. Los compuestos de interés se podrían analizar por cromatografía de gases, sin tratamiento adicional de los extractos, ya que todos ellos mostraron respuestas cromatográficas y tiempos de retención por debajo de 20 min en las condiciones experimentales seleccionadas. Sin embargo, la etapa de derivatización es altamente recomendada para el análisis por cromatografía de gases de compuestos de naturaleza polar tales como los fenoles; en este caso, la acetilación con anhídrido acético es un proceso de derivatización sencillo y barato para compuestos fenólicos en medio acuoso (Rodríguez et al., 2000; Polo et al., 2006). Por ello, se probó el procedimiento mejorado de acetilación propuesto por Regueiro y colaboradores (Regueiro et al., 2009). Los resultados obtenidos confirmaron la acetilación de los compuestos fenólicos (TBP y PP), con tiempos de retención mayores que los de los compuestos no derivatizados y con formas de pico cromatográfico mucho más simétricas. Los espectros de masas de los derivados acetilados se asemejan a los espectros de los correspondientes compuestos no derivatizados ya que los iones moleculares no están presentes y únicamente se observan diferencias mínimas en la intensidad de los iones más abundantes. La ausencia de iones moleculares en los

espectros de masas de los derivados acetilados de fenoles, como una consecuencia de la pérdida del grupo acetilo en la ionización, se ha descrito anteriormente (Sánchez-Prado et al., 2010; Croley y Lynn, 1998). La adición de reactivos derivatizantes a las muestras modifica el medio de la muestra y puede afectar la extracción de los compuestos no-fenólicos. Por esta razón, la adición de reactivos derivatizantes, se ha incluido como un factor en el diseño experimental. El efecto del tiempo de extracción se examinó a dos niveles, 5 y 10 minutos. El último factor que se ha considerado es el efecto salino. La adición de cloruro de sodio en la disolución acuosa se evaluó a tres concentraciones, 0% (sin adición), 15% (w/v) y 30% (w/v).

La estrategia de optimización seleccionada consistió en un diseño experimental $3 \times 2^{3-1}$ que implica un total de 12 experimentos. Los factores, sus niveles y sus correspondientes claves de identificación se muestran en la Tabla 4.5. El diseño seleccionado permite determinar qué factores tienen un efecto estadísticamente significativo, así como cuáles son las interacciones entre los factores. Los experimentos se realizaron con alícuotas de 10 mL de agua milliQ fortificadas con los analitos a una concentración de 5 ng mL^{-1} .

Tabla 4.5. Factores y niveles seleccionados para la optimización mediante diseño experimental.

Factor	Clave	Nivel		
		Bajo	Intermedio	Alto
NaCl (%)	A	0	15	30
Tiempo (min)	B	5		10
Tipo de disolvente	C	Cloroformo (CLF)		1,1,1-Tricloroetano (TCE)
Reactivos derivatizantes	D	No		Si

El análisis numérico de los datos a partir del diseño experimental se realizó con la herramienta estadística Statgraphics XV Centurion (Manugistics, Rockville, MD, USA). Los resultados de ANOVA se muestran en la Tabla 4.6. Para simplificar, sólo se han incluido las interacciones entre los factores que fueron significativas en algún caso.

Tabla 4.6. Relaciones F y valores p obtenidos en el ANOVA

Compuestos	Efectos principales						Interacciones										
	A: NaCl		B: Tiempo		C: Tipo de disolvente		D: reactivos derivatizantes		AD		BC		AA		CD		
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	
BTZ	69.49	+	2.29	+	13.16	+	0.12					26.99	+			12.25	+
TBP	11.41	+	0.03		8.92		75.26	+	99.03	+	15.6	+					
PP	39.83	+	0.03		0.18		234.63	+	44.43	+							
PBO	1.99		2.49		1.91		68.03	+					51	+			

+: significativo

Parte Experimental y Resultados

La información de ANOVA se puede observar claramente en los diagramas Pareto (Figura 4.1). En este gráfico la longitud de cada barra es proporcional al valor absoluto de su efecto estandarizado asociado. La línea vertical en los gráficos representa el valor estadísticamente significativo vinculado al nivel de confianza del 95%. Los gráficos de efectos principales se muestran en la Figura 4.2.

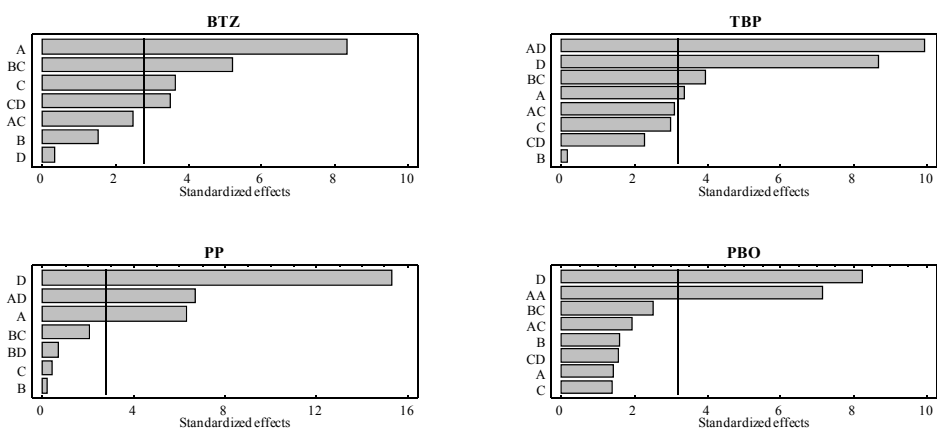


Figura 4.1. Diagramas Pareto (clave de los efectos en la Tabla 4.5)

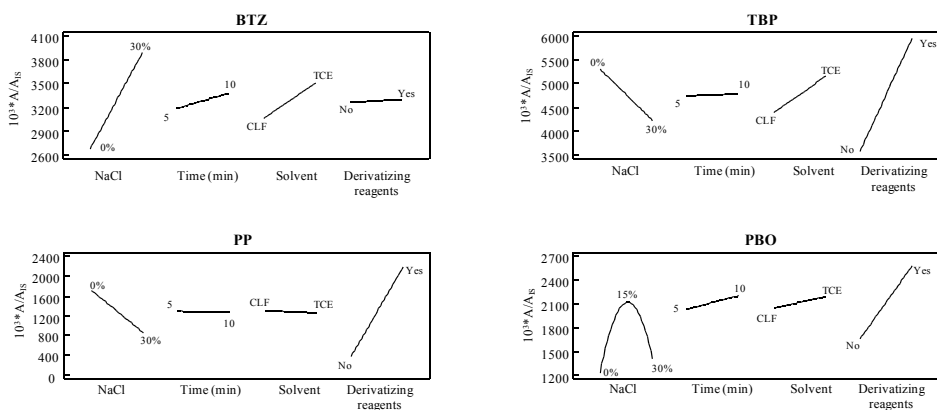


Figura 4.2. Gráficos de efectos principales.

En este tipo de gráficos se muestran los efectos principales con una línea trazada entre el nivel bajo y alto de los factores correspondientes. La longitud de las líneas es proporcional a la magnitud del efecto de cada factor en el proceso de extracción, y el signo de la pendiente indica el nivel del factor que produce la máxima respuesta.

La concentración del cloruro de sodio y la adición de los reactivos derivatizantes fueron los factores más importantes y su influencia se muestra claramente en la Figura 4.2. Para dos de los compuestos estudiados (TBP y PP) se observaron mayores eficacias de extracción altas cuando no se adicionó cloruro de sodio, mientras que para el BTZ la respuesta más alta se obtiene cuando se adiciona un 30% de cloruro de sodio. La adición de agentes acetilantes supuso una eficacia de extracción significativamente más alta para TBP, PP y PBO. Aunque el PBO no reacciona a la acetilación, parece que la presencia de los reactivos derivatizantes aumenta la tendencia de PBO a disolverse en la fase extractante. El disolvente de extracción fue significativo para el BTZ aunque la respuesta obtenida con tricloroetano fue sólo un 10% superior a la obtenida con cloroformo. Puesto que el precio del cloroformo es significativamente menor se optó por seleccionar este disolvente. El tiempo de extracción no fue significativo en ningún caso.

La interacción entre los dos factores más importantes, adición de cloruro de sodio y reactivos derivatizantes (AD), fue significativa para TBP y PP, siendo el factor más importante para el TBP (ver la figura 4.1). La presencia del cloruro de sodio tiene un efecto adverso en la extracción de los compuestos a partir de las disoluciones acuosas que contienen los reactivos acetilantes. Considerando los resultados del diseño experimental, las condiciones generales seleccionadas para la extracción mediante USAEME y derivatización simultánea *in-situ* de los compuestos de interés a partir de muestras de agua fueron las

siguientes: adición de los reactivos de acetilación a las muestras, extracción con cloroformo y tiempo de aplicación de ultrasonidos de 5 minutos.

4.4 Parámetros analíticos de calidad del método

El método propuesto se evaluó en términos de exactitud, precisión, linealidad, y límites de cuantificación. La linealidad se comprobó con patrones acetilados preparados en cloroformo a concentraciones que van desde 2 hasta 1000 ng mL⁻¹. Para todos los compuestos se obtuvieron coeficientes de correlación (R) entre 0.9999 y 1.0000 (Tabla 4.7). Los límites de detección instrumental (IDL), estimados para una relación señal/ruido de 3 (S/N=3), oscilaron entre 0.001 hasta 0.006 ng mL⁻¹.

Con el fin de evaluar la viabilidad del método propuesto, los estudios de recuperación se realizaron con muestras de agua reales. La exactitud del método se evaluó utilizando muestras de agua de un manantial, un efluente y un influente de una estación depuradora de aguas residuales, fortificadas a concentraciones de 1, 0.5 y 2 ng mL⁻¹, respectivamente. Las recuperaciones se calcularon dividiendo la diferencia entre las concentraciones medidas para muestras fortificadas y no fortificadas entre las concentraciones añadidas. En la Tabla 4.7 se observa que las recuperaciones fueron satisfactorias para todos los compuestos, con valores que van desde el 68.3% hasta el 111%. La precisión del método se evaluó mediante el cálculo de la desviación estándar relativa (RSD) a los mismos niveles de concentración. Estos resultados se muestran en la Tabla 4.7 y en todos los casos los valores obtenidos fueron inferiores al 10%.

Tabla 4.7. Parámetros analíticos del método propuesto.

Compuesto	Linealidad (R)	LOQ (ng mL ⁻¹)	Recuperaciones ± RSD (% , n=3)		
			Efluente	Influyente	Manantial
BTZ	0.9999	0.072	88.7±4.7	96.1 ± 7.1	76.5 ± 6.1
TBP	1.0000	0.004	96.7±0.5	69.7 ± 7.7	86.4 ± 4.9
PP	0.9999	0.004	92.2±5.2	72.8 ± 8.0	68.3 ± 5.1
PBO	0.9999	0.020	111±8	106 ± 3	70.9 ± 9.9

En la Tabla 4.7 se muestran los valores de LOQ del método propuesto que van desde 0.004 ng mL⁻¹ hasta 0.072 ng mL⁻¹. Durante los estudios de desarrollo y optimización del método se observó la presencia de BTZ en los blancos de agua, por lo que el límite de cuantificación para este compuesto se estimó como la cantidad media de analito correspondiente a la respuesta en los blancos más 10 veces la desviación estándar (LOQ = señal del blanco + 10SD). El origen del BTZ en los blancos se atribuye a su posible presencia en el agua ultrapura, aunque no se puede descartar la contaminación durante el procedimiento analítico.

4.5 Análisis de muestras reales

Finalmente el método propuesto se aplicó al análisis de varias muestras de agua no fortificadas, que incluyen agua de río e influentes y efluentes de diferentes estaciones depuradoras de agua residual. Se confirmó la presencia de los analitos en las muestras. El BTZ se encontró por encima del límite de cuantificación en todas las muestras, a

concentraciones entre 0.10 y 0.37 ng mL⁻¹ (Tabla 4.8). El TBP y el PP se encontraron en algunos de los efluentes, mientras que PBO se detectó en tres de las siete muestras, todas ellas correspondientes a aguas residuales.

Tabla 4.8. Compuestos de interés encontrados en las muestras de ríos y aguas residuales (ng mL⁻¹).

Compuesto	Rio 1	Rio 2	Ef. EDAR1	Ef. EDAR2	Ef. EDAR4	Inf. EDAR3	Inf. EDAR4
BTZ	0.137	0.222	0.204	0.37	0.164	0.123	0.101
TBP	-	-	-	0.113	-	-	-
PP	-	-	0.0891	0.123	-	-	-
PBO	-	-	0.024	-	-	0.025	0.031

4.6 Experimentos de cloración

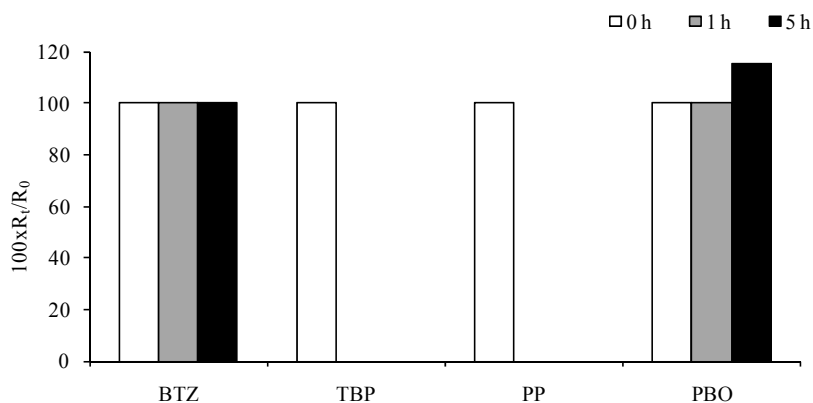
Los compuestos de interés se han encontrado en aguas que pueden ser tratadas para consumo humano y para otros usos como el recreativo. La cloración es un procedimiento generalizado de desinfección del agua que puede ser útil para eliminar diversos compuestos, pero también puede generar subproductos clorados no deseables.

El hipoclorito de sodio en disolución acuosa existe principalmente como ácido hipocloroso y anión hipoclorito, ambos pueden reaccionar con compuestos orgánicos por adición, sustitución u oxidación. En los procesos de desinfección influyen muchos factores sobre la formación y distribución de los subproductos de cloración, por ejemplo la dosis de cloro y el tiempo de cloración.

Se llevaron a cabo experimentos con el fin de comprobar si los compuestos estudiados se degradan en presencia de cloro. En este caso, se adicionó hipoclorito de sodio a agua MilliQ (pH = 5.6) para alcanzar una concentración final de 4 mg L^{-1} expresada como cloro, que es el nivel máximo de desinfectante residual (MRDL) regulado por la EPA (Su et al., 2007) y sobre 10 veces más de la concentración mínima recomendada para el “punto de ruptura” de la cloración (Mocho et al., 2007). La muestra se extrajo y se analizó después de 1 hora y 5 horas de reacción. Estos experimentos se realizaron sin la adición de reactivos de derivatización para evitar posibles interferencias. Se observó la degradación completa de TBP y PP después de 1 hora de reacción, mientras que las respuestas de BTZ y PBO no se vieron afectadas (Figura 4.3a).

La influencia de la concentración inicial de cloro en la degradación de TBP y PP se evaluó después de 1.5 horas de reacción. Como puede verse en la Figura 4.3b, la concentración de TBP y PP se reduce al aumentar la concentración de cloro. La exposición a bajas concentraciones de cloro (0.2 mg L^{-1}) sólo disminuye la concentración de TBP y de PP en un 3% y un 13%, respectivamente, mientras que las concentraciones residuales finales de ambos compuestos a nivel de cloración de 1.5 mg L^{-1} fueron del 16% para el TBP y del 5% para PP.

a



b

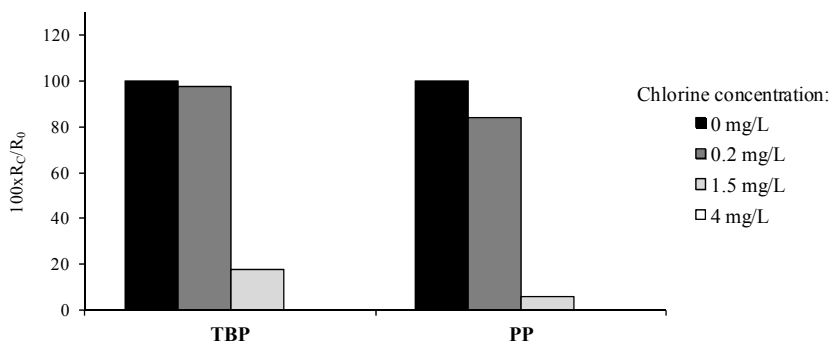


Figura 4.3. **(a)** Respuestas relativas obtenidas después de 1 y 5 horas de reacción con cloro (4 mg L^{-1}) (R_t : Respuesta a tiempo t ; R_0 : respuesta a tiempo 0) **(b)** Efecto de la concentración de cloro en la degradación de TBP y PP (R_c : Respuesta a concentración C ; R_0 : respuesta a concentración 0, 1.5 h de reacción).

Se determinó la cinética de degradación de TBP y PP en presencia de 1.5 mg L^{-1} de cloro. Los resultados se representan en la Figura 4.4. En esta figura se observa que en menos de una hora de reacción (aproximadamente 45 min) las concentraciones de ambos compuestos se reducen a la mitad, y la degradación de ambos compuestos fue completa ($> 94\%$) después de 5 h de reacción. La degradación del PP

fue ligeramente más rápida que la del TBP. Estas reacciones siguen una cinética de reacción de pseudo-primer orden. Las constantes de velocidad de primer orden (k_{ap}) se pueden determinar como las pendientes de las ecuaciones lineales obtenidas a partir de la regresión lineal: $\ln C$ vs tiempo. El tiempo de vida media correspondiente a cada compuesto se calcula utilizando la expresión siguiente: $t_{1/2} = \ln 2/k_{ap}$. Estos datos se incluyen en la Figura 4.4.

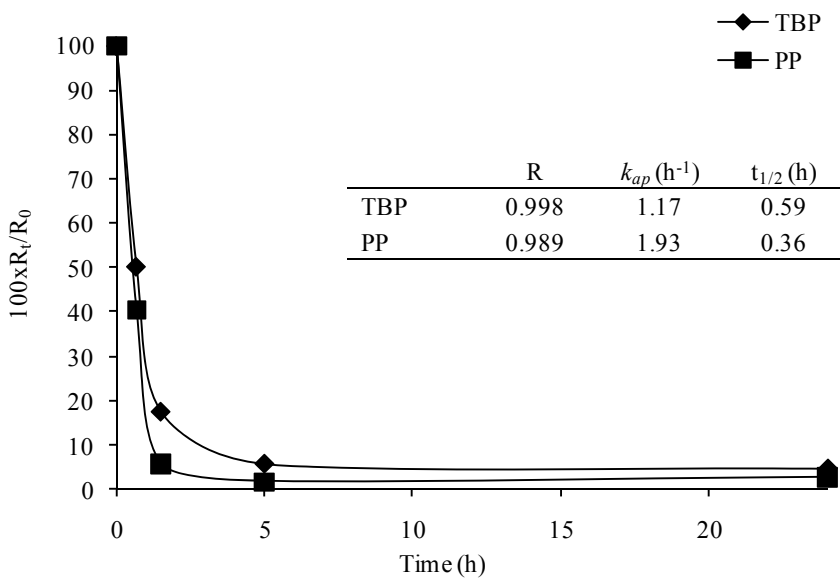


Figure 4.4. Cinética de degradación de TBP y PP (concentración de cloro: 1.5 mg L⁻¹). Se muestran los parámetros cinéticos calculados experimentalmente.

Las reacciones de degradación de TBP y PP en presencia de cloro condujeron a la formación de varios subproductos, cinco de los cuales se detectaron en estos experimentos, como puede verse en el cromatograma de una muestra de agua clorada (1.5 mg L⁻¹) en la Figura 4.5.

Parte Experimental y Resultados

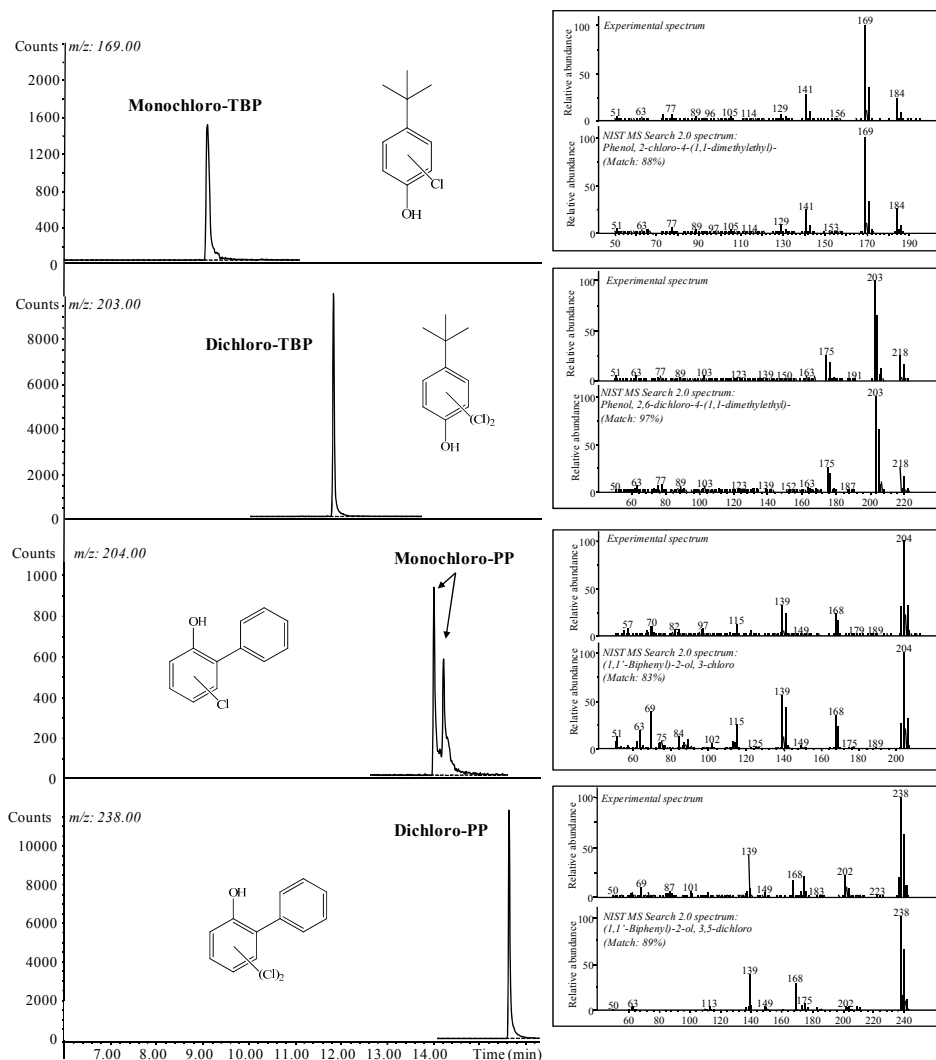


Figura 4.5. Cromatogramas de los subproductos de cloración del TBP y PP (concentración de cloro: 1.5 mg de L^{-1}). Se muestra el espectro de masas experimental de los subproductos y el obtenido mediante la librería NIST.

Se ha propuesto la identificación de estos subproductos en base a sus espectros de masas y los resultados se muestran en la Figura. Dos de ellos se forman por la cloración de TBP (monocloro-TBP y dicloro-TBP), y los otros tres se generan cuando el PP se combina con uno y dos

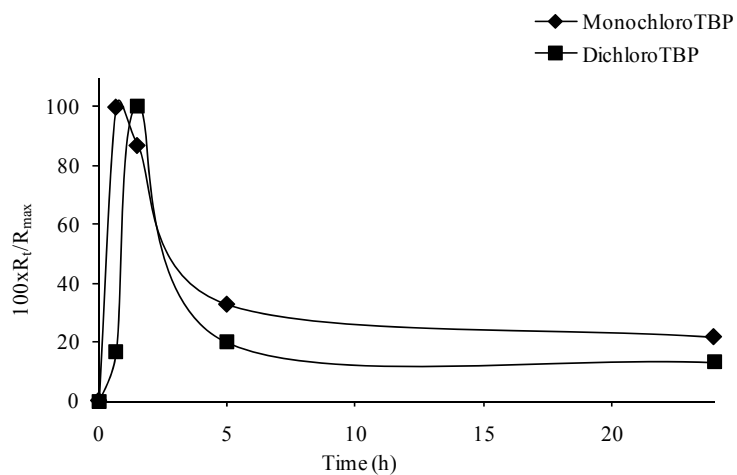
átomos de cloro (se han detectado dos isómeros para el derivado monoclorado). Aunque la formación de subproductos durante la desinfección con cloro de compuestos fenólicos se ha descrito anteriormente (Ge et al., 2008; Gallard et al., 2004) así como de otros disruptores endocrinos (Deborde et al., 2004; Hu et al., 2003), esta es la primera vez que se describe la formación de subproductos clorados de TBP y PP.

En la Figura 4.6 se muestra la cinética de formación y degradación de los subproductos detectados. Se puede apreciar que el monocloro-TBP alcanza su máximo en 40 minutos (Figura 4.6a), cuando la degradación del TBP alcanza el 50% (ver Figura 4.4).

En este tiempo de reacción, la formación de dicloro-TBP es del 20% y aumenta rápidamente hasta su máximo después de 1.5 h. Para ambos compuestos, las cinéticas son muy similares y muestran que después de 5 h las concentraciones residuales de ambos derivados clorados se mantienen en el intervalo del 20% al 35% y permanecen estables a lo largo del tiempo (24 h).

En la Figura 4.6b se muestra el comportamiento cinético de los subproductos del PP. En este caso, los derivados monoclorados se forman rápidamente, alcanzando el 100% en 40 min. Después de este tiempo, el primer subproducto monoclorado se transforma en dicloro-PP, que alcanza rápidamente su máximo en 1.5 h. Las curvas de formación-degradación de monocloro-PP2 y dicloro-PP son similares a partir de 1.5 h hasta el final del experimento (24h). Se muestra que ambos derivados son muy estables, con concentraciones remanentes en el agua del 60% al 80% de la cantidad máxima formada.

a



b

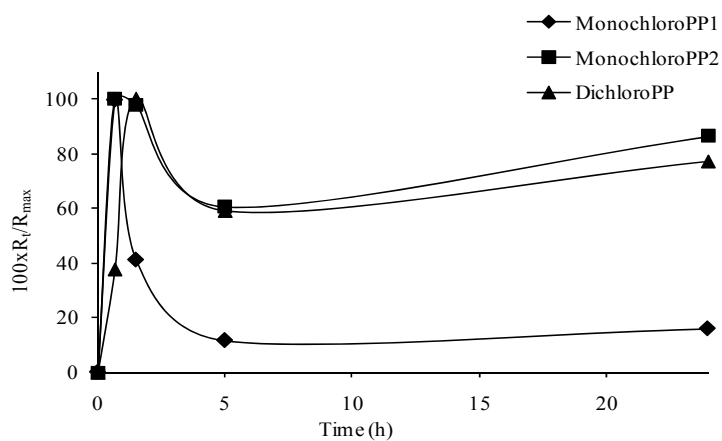


Figura 4.6. **(a)** Cinética de formación y degradación de los subproductos del TBP. **(b)** Cinética de formación y degradación de los subproductos del PP.

Bibliografía

- Badoil L., Benanou D., (2009) Characterization of volatile and semivolatile compounds in waste landfill leachates using stir bar sorptive extraction–GC-MS, *Anal Bioanal Chem*, 393, 1043-1054.
- Becerril-Bravo E., Lamas J. P., Sanchez-Prado L., Lores M., Garcia-Jares C., Jimenez B., Llompart M., (2010) Ultrasound-assisted emulsification–microextraction of fragrance allergens in water, *Chemosphere*, 81, 1378-1385.
- Brownlee B.G., Carey J.H., MacInnis G.A., Pellizzari I.T., (1992) Aquatic environmental chemistry of 2-(thiocyanomethylthio)benzothiazole and related benzothiazoles, *Environ Toxicol Chem*, 11, 1153-1168.
- Brusick D., (2005) Analysis of genotoxicity and the carcinogenic mode of action for ortho-phenylphenol, *Environ Mol Mutagen*, 45, 460-481.
- Cabaleiro N., Pena-Pereira F., de I.C.I., Bendicho C., Lavilla I., (2011) Determination of triclosan by cuvetteless UV-vis microspectrophotometry following simultaneous ultrasound assisted emulsification-microextraction with derivatization: Use of a micellar-ionic liquid as extractant, *Microchem J*, 99, 246-251.
- CARB (1997) Toxic Air Contaminant Fact Sheet — 2-Phenylphenol. Sacramento, CA, California Air Resources Board.
- Casas V., Llompart M., Garcia-Jares C., Cela R., Dagnac T. (2007) Effects of sample pretreatment and storage conditions in the determination of pyrethroids in water samples by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry, *Anal Bioanal Chem*, 387(5), 1841-1849.
- Chunhong J., Xiaodan Z., Li C., Min H., Pingzhong Y., Ercheng Z., (2010) Extraction of organophosphorus pesticides in water and juice using ultrasound-assisted emulsification–microextraction, *J Sep Sci*, 33, 244-250.
- Croley T.R., Lynn B.C., (1998) Molecular ion stabilization for enhanced tandem mass spectrometry through derivatization for alkylphenols, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 12, 171-175.
- Deborde M., Rabouan S., Gallard H., Legube B., (2004) Aqueous chlorination kinetics of some endocrine disruptors, *Environ Sci Technol*, 38, 5577-5583.
- Diel F., Horr B., Borck H., Savtchenko H., Mitsche T., Diel E. (1999) Pyrethroids and piperonyl-butoxide affect human T-lymphocytes in vitro, *Toxicol Lett*, 107(1-3), 65-74.
- Fontana A. R., Wuilloud R. G., Martínez L. D., Altamirano J. C. (2009)

Simple approach based on ultrasound-assisted emulsification-microextraction for determination of polibrominated flame retardants in water samples by gas chromatography–mass spectrometry, *J Chromatogr A*, 1216, 147-153.

Gallard H., Leclercq A., Croué J.-P., (2004) Chlorination of bisphenol A: kinetics and by-products formation, *Chemosphere*, 56, 465-473.

Ge F., Zhu L., Wang J., (2008) Distribution of chlorination products of phenols under various pHs in water disinfection, *Desalination*, 225, 156-166.

Gomez M.J., Gomez-Ramos M.M., Aguera A., Mezcua M., Herrera S., Fernandez-Alba A.R., (2009) A new gas chromatography/mass spectrometry method for the simultaneous analysis of target and non-target organic contaminants in waters, *J Chromatogr A*, 1216, 4071-4082.

Haavisto T.E., Adamsson N.A., Myllymäki S.A., Toppari J., Paranko J., (2003) Effects of 4-tert-octylphenol, 4-tert-butylphenol, and diethylstilbestrol on prenatal testosterone surge in the rat *Reproductive, Toxicology*, 17, 593-605.

Hu J., Cheng S., Aizawa T., Terao Y., Kunikane S., (2003) Products of aqueous chlorination of 17 β -estradiol and their estrogenic activities, *Environ Sci Technol*, 37, 5665-5670.

Kloepfer A., Jekel M., Reemtsma T. (2005) Occurrence, sources, and fate of benzothiazoles in municipal wastewater treatment plants, *Environ Sci Technol*, 39 (10), 3792–3798.

Llompart M., Lourido M., Landín P., García-Jares C., Cela R., (2002) Optimization of a derivatization–solid-phase microextraction method for the analysis of thirty phenolic pollutants in water samples, *J Chromatogr A*, 963, 137-148.

Mocho P., Larroque V., Desauziers V., (2007) Modelling of toluene solid-phase microextraction for indoor air sampling, *Anal Bioanal Chem*, 388, 147-156.

Ozcan S., Tor A., Aydin M. E. (2009) Application of ultrasound-assisted emulsification-micro-extraction for the analysis of organochlorine pesticides in waters, *Water Res*, 43, 4269-4277.

Polo, M. Llompart M., Garcia-Jares C., Gomez-Noya G., Bollain M.-H., Cela R., (2006) Development of a solid-phase microextraction method for the analysis of phenolic flame retardants in water samples, *J Chromatogr A*, 1124, 11-21.

Reemtsma T., Fiehn O., Kalnowski G., Jekel M., (1995) Microbial Transformations and Biological Effects of Fungicide-Derived

Benzothiazoles Determined in Industrial Wastewater, *Environ Sci Technol*, 29, 478-485.

Regueiro J., Llompart M., Garcia-Jares C., Garcia-Montegudo J. C., Cela R. (2008) Ultrasound-assisted emulsification–microextraction of emergent contaminants and pesticides in environmental waters, *J Chromatogr A*, 1190, 27-38.

Regueiro J., Llompart M., Psillakis E., Garcia-Montegudo J. C., Garcia-Jares C. (2009) Ultrasound-assisted emulsification–microextraction of phenolic preservatives in water, *Talanta*, 79, 1387-1397

Rodil R., Quintana J.B., Concha-Grana E., Lopez-Mahia P., Muniategui-Lorenzo S., Prada-Rodriguez D., (2012) Emerging pollutants in sewage, surface and drinking water in Galicia (NW Spain), *Chemosphere*, 86, 1040-1049.

Rodríguez I., Llompart M.P., Cela R., (2000) Solid-phase extraction of phenols, *J Chromatogr A*, 885, 291-304.

Sanchez-Prado L., Lamas J.P., Lores M., Garcia-Jares C., Llompart M., (2010) Simultaneous in-cell derivatization pressurized liquid extraction for the determination of multiclass preservatives in leave-on cosmetics, *Anal Chem*, 82, 9384-9392.

Su H.-J., Chao C.-J., Chang H.-Y., Wu P.-C., (2007) The effects of evaporating essential oils on indoor air quality, *Atmos Environ*, 41, 1230-1236.

Tovalin-Ahumada H., Whitehead L., (2007) Personal exposures to volatile organic compounds among outdoor and indoor workers in two Mexican cities, *Sci Total Environ*, 376, 60-71.

UNEP (2000), PHENOL, 4-(1,1,3,3-TETRAMETHYLBUTYL)-, OECD SIDS, UNEP Publications, 1-54.

WHO (2003) 2-Phenylphenol in Drinking-water Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality.

IV. Conclusiones

IV. Conclusiones

A lo largo de este trabajo de Tesis se han desarrollado metodologías analíticas sencillas, fiables y rápidas para la determinación de contaminantes emergentes en agua. Estas metodologías se aplicaron a varias familias de compuestos: fármacos ácidos, disruptores endocrinos potenciales, fragancias alérgicas y compuestos de alto volumen de producción.

Las técnicas de preparación de muestras empleadas fueron: Extracción en fase sólida (SPE), microextracción en fase sólida (SPME) y microextracción-emulsificación asistida por ultrasonidos (USAEME).

Se realizó la optimización de las variables que afectan a los procesos de extracción mediante diferentes tipos de diseños experimentales. Esto permitió disminuir al mínimo el número de experimentos, además de conocer las interacciones entre factores e interpretar eficazmente los resultados.

Se evaluaron los parámetros de calidad de los métodos analíticos en términos de linealidad, recuperación, repetibilidad y reproducibilidad los cuales fueron satisfactorios. Los métodos propuestos presentan buena sensibilidad lo que indica límites de detección aceptables.

A continuación se exponen las conclusiones específicas para cada estudio:

Determinación de fármacos ácidos y compuestos potencialmente disruptores endocrinos en agua de abastecimiento, por elución selectiva y determinación por GC-MS

Se desarrolló un método analítico para la determinación y cuantificación de fármacos ácidos, compuestos químicos disruptores endocrinos potenciales y dos pesticidas, aplicable para aguas residuales sin tratamiento, para aguas de manantiales, de pozos y de otras fuentes superficiales de abastecimiento. El método es robusto, tiene límites de detección prácticos y se puede utilizar para analizar aguas residuales sin tratar por cromatografía de gases-espectrometría de masas. La elución de los ácidos supone un efectivo y rápido método de limpieza para los compuestos disruptores endocrinos. Los compuestos propuestos fueron determinados en aguas residuales provenientes de la ciudad de México, en manantiales formados por la recarga indirecta mediante el riego con esas aguas residuales, así como en fuentes de abastecimiento de agua potable del Valle de México.

Las concentraciones encontradas en el agua residual fueron comparables con las reportadas en la bibliografía. Algunos de los analitos se encontraron en el agua de manantial y de pozos pero a concentraciones mucho menores que las del agua residual; esto indica que son eliminados al pasar el agua residual por el suelo y subsuelo hasta llegar a los acuíferos.

Determinación de fragancias potencialmente alérgicas por microextracción en fase sólida.

La combinación de SPME y GC-MS demostró ser un procedimiento simple y eficaz para la determinación de fragancias alérgicas reguladas en aguas.

La optimización de la extracción se llevó a cabo mediante un diseño experimental que demostró que el modo de extracción y la temperatura son las variables que tienen influencia en la eficacia de extracción. Las condiciones experimentales óptimas implican el uso del recubrimiento PDMS/DVB para la extracción en el modo de espacio de cabeza a 100 °C.

El método fue validado y demostró ser lineal en el rango de concentraciones de interés. Los límites de detección fueron satisfactorios ($0.001-1.1 \text{ ng mL}^{-1}$), así como la reproducibilidad (RSD <12%). Las recuperaciones obtenidas (> 80% para la mayoría de los compuestos) fueron cuantitativas incluso para aguas residuales. La aplicación del método a muestras de agua de baño para bebés, aguas de piscina y aguas residuales, demostró la presencia de alérgenos en todas las muestras. En el agua de baño de bebé algunos compuestos se encontraron en concentraciones de varios cientos de ng mL^{-1} , mientras que en las aguas residuales las concentraciones fueron del nivel de las reportadas para otras fragancias como los almizcles.

Determinación de fragancias alérgicas por microextracción-emulsificación asistida por ultrasonidos.

Se desarrolló un método basado en la microextracción-emulsificación asistida por ultrasonidos (USAEME) acoplada a GC-MS para el análisis de fragancias alérgicas reguladas en agua. La USAEME se propone como una alternativa eficaz, sencilla, rápida, respetuosa del medio ambiente y de bajo coste en comparación con otras técnicas de extracción como la extracción en fase sólida SPE, SPME y LPME.

La precisión del método fue satisfactoria y los límites de detección se obtuvieron en nivel de sub-nanogramo por mililitro. No se observó efecto matriz, por tanto, la cuantificación se puede llevar cabo por medio de calibración con estándares. El método propuesto se aplicó para el análisis de varias muestras de agua, incluyendo agua del grifo, agua de bañero de bebés, aguas recreativas, procedentes de un lavadero público y aguas residuales. La presencia de fragancias alérgicas fue confirmada en todas las muestras, lo que demuestra la ubicuidad de estos compuestos.

Microextracción-emulsificación asistida por ultrasonidos para el análisis de compuestos químicos de alto volumen de producción en muestras de agua.

Se optimizó un método basado en la microextracción-emulsificación asistida por ultrasonidos (USAEME) para el análisis en el agua de cuatro productos químicos de alto volumen producción: benzotiazol, 4-*tert*-butilfenol, 2-fenilfenol y butóxido de piperonilo. La USAEME se propone como una técnica de extracción eficiente y económica. Las recuperaciones obtenidas fueron adecuadas, incluso en muestras de agua complejas (aguas residuales). La precisión del método fue satisfactoria y los límites de cuantificación en el sub-nanogramo por mililitro.

El método propuesto se aplicó al análisis de varias muestras reales de agua, incluyendo ríos y aguas del influente y efluente de estaciones depuradoras de agua residual. Debido a que no se observó efecto matriz, la cuantificación se puede llevar a cabo por medio de calibración externa con estándares en cloroformo, lo que permite un alto rendimiento del análisis y simplicidad de procedimiento. La presencia de los compuestos estudiados se confirmó en las muestras de agua.

Los estudios de cloración mostraron la degradación de los compuestos fenólicos 4-*tert*-butilfenol y 2-fenilfenol y su transformación en derivados mono y di-clorados, algunos de ellos bastante persistentes. Por otro lado, el benzotiazol y el butóxido de piperonilo se mantuvieron estables, incluso a concentraciones de cloro de 4 mg L⁻¹.

ANEXO I

ANEXO I: Abreviaturas y Acrónimos**A**

ANOVA	AN alysis O f VA riance	Análisis de la varianza
ATSDR	A gency for T oxic S ubstances and D isease R egistry	Agencia para el registro de sustancias tóxicas y enfermedades

B

BBP		<i>n</i> -Butil bencil ftalato
BSTFA		<i>N,O</i> - bis(Trimetilsilil)trifluoroacetamida
BTZ		Benzotiazol

C

CAS	C hemical A bstracts S ervice	
CE		Comisión Europea
CONAGUA		Comisión Nacional del Agua
CEE		Comisión Económica Europea
CLLE	C ontinuous L iquid – L iquid E xtraction	Extracción Líquido – Líquido Continua

D

2,4-D		Ácido 2,4- diclorofenoxiacético
-------	--	------------------------------------

Anexo I: Abreviaturas y Acrónimos

3,4-D		Ácido 3,4-diclorofenoxiacético
2,3 -D		Ácido 2,3-diclorofenoxiacético
DBO ₅		Demanda Bioquímica de Oxígeno a 5 días
DQO		Demanda Química de Oxígeno
DEHP		Bis-2-etilhexilfitalato
DF		D istrito F ederal
DLLME	D ispersive L iquid– L iquid M icroextraction	Microextracción líquido-líquido dispersiva
DVB	D ivinyl b enzene	Divinilbenceno
E		
EEC	E uropean E conomic C ommunity	Comunidad Económica Europea (CEE)
EI	E lectronic I mpact	Impacto electrónico
EPA	E nvironmental P rotection A gency	Agencia de Protección Ambiental
EDAR		Estación Depuradora de Aguas Residuales
EU	E uropean U ion	Unión Europea
ETAAS		Espectrometría de absorción atómica electrotérmica
EE2		17 α -Etilestradiol

F

FAAS		Espectrometría de absorción atómica de llama
------	--	--

G

GC	Gas Chromatography	Cromatografía de gases
GC-ECD	Gas Chromatography-Electronic Capture Detector	Cromatografía de gases-Detector de captura electrónica
GC-FID	Gas Chromatography – Flame Ionization Detector	Cromatografía de gases – Detector de ionización en llama
GC-MS	Gas Chromatography – Mass Spectrometry	Cromatografía de gases – Espectrometría de masas
GC-MS/MS	Gas Chromatography – Mass Spectrometry Tandem	Cromatografía de gases –espectrometría de masa en tándem

H

HF-LPME	Hollow-Fiber Liquid Phase Microextraction	Microextracción en fase líquida en fibra hueca
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Cromatografía líquida de alta resolución

Anexo I: Abreviaturas y Acrónimos

HPLC-DAD	H igh P erformance L iquid C homatography – Diode-Array Detection	Cromatografía líquida de alta resolución con detector de red de diodos
HPLC-FLD	H igh P erformance L iquid C homatography – F luorescence D etector	Cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia
HPLC UV-VIS	H igh P erformance L iquid C homatography – U ltraviolet - Visible	Cromatografía líquida de alta resolución con detector ultravioleta - visible
HPVC	H igh P roduction V olume C hemicals	Compuestos de Alto Volumen de Producción
HS-SPME	H eadspace- S olid P hase M icroextraction	Microextracción en fase sólida en espacio de cabeza
I		
IARC	I nternational A gency for R esearch on C ancer	Agencia internacional de investigación sobre el cáncer
IFRA	I nternational F ragrance A ssociation	Asociación Internacional de Perfumería
IKW	German Cosmetic, Toiletry, Perfumery and Detergent Association	
IPCS	I nternational P rogram on C hemical S afety	Programa internacional de seguridad de las

		sustancias químicas
IUPAC	I nternational U nion of P ure and A ppplied C hemistry	Unión Internacional de Química pura y aplicada
K		
K _{ow}	P artition C onstant O ctanol- W ater	Constante de reparto octanol-agua
L		
LC	L iquid C hromatography	Cromatografía líquida
LC ₅₀	L ethal C oncentration (50%)	Concentración letal para el 50% de la población expuesta
LC-MS	L iquid C hromatography – M ass S pectrometry	Cromatografía líquida-Espectrometría de masas
LC-UV		
LD ₅₀	L ethal D ose (50%)	Dosis letal para el 50% de la población expuesta
LLE	L iquid- L iquid E xtraction	Extracción líquido-líquido
LOAEL	L owest O bserved A dverse E ffect L evel	
LOD	L imit of D etection	Límite de detección
LOQ	L imit of Q uantification	Límite de cuantificación

LPVC	Low Production Volume Chemicals	Compuestos de Bajo Volumen de Producción
M		
MCL	Maximum Contaminant Level	Nivel máximo de contaminante
MESI	Membrane Extraction with Sorbent Interface	Extracción en membrana con interfase de sorbente
min		minutos
MMLLE	Microporous Membrane Liquid-Liquid Extraction	Extracción líquido-líquido en membrana microporosa
MS	Mass Spectrometry	Espectrometría de masas
MTBSTFA		<i>N-tert</i> -butildimetilsilil- <i>N</i> -metiltri-fluoroacetamida
N		
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level	
NOEL	No-Observed Effect Level	
NOM		Norma Oficial Mexicana

O

OMS **Organización Mundial de Salud**

P

PA	Polyacrylate	Poliacrilato
PBO		Butóxido de piperonilo
PCB	Polychlorinated Biphenyl	Bifenilo policlorado
PC-HFME	Polymer-Coated Hollow Fibre Microextraction	Microextracción en fibra hueca con cubierta polimérica
PCPs	Personal Care Products	Productos de cuidado personal
PDMS	Polydimethylsiloxane	Polidimetilsiloxano
PDMS - DVB	Polydimethylsiloxane - Divinylbenzene	Polidimetilsiloxano - divinilbenceno
POPs	Persistent Organic Pollutants	Contaminates Orgánicos Persistentes (COPs)
PP		2-Fenilfenol
PPCPs	Pharmaceutical and Personal Care Products	Productos farmacéuticos y de cuidado personal
PTBP-FR		<i>p-tert</i> -Butilfenol-formaldehído

Q

q Radio frecuencia (RF) voltaje de frecuencia constant y amplitude

variable que se aplica al electrodo de la trampa de iones

R

RSD **Relative Standard Deviation** Desviación estándar relativa

S

SBSE **Stir Bar Sorptive Extraction** Extracción adsorptiva con barra agitadora

SCCNFP **Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products** Comité científico de productos cosméticos y productos no alimentarios

SPE **Solid Phase Extraction** Extracción en fase sólida

SPME **Solid Phase Microextraction** Microextracción en fase sólida

T

TBP *4-tert*-Butilfenol

U

USAEME **Ultrasound-Assisted Emulsification Microextraction** Microextracción – emulsificación asistida por ultrasonidos

UV **UltraViolet** Ultravioleta

W

WGK

**Water Hazard
Classification**

WHO

**World Health
Organization**

Organización Mundial
de la Salud (OMS)

ANEXO II

ANEXO II: Listado de publicaciones

Durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral se han publicado o están pendientes de publicación en revistas científicas los trabajos siguientes:

Gibson Richard., Becerril Bravo Elias., Silva Castro Vanesa., Jiménez Cisneros Blanca., (2007) **Determination of acidic pharmaceuticals and potential endocrine disrupting compounds in wastewaters and spring waters by selective elution and determination by gas chromatography - mass spectrometry**, *Journal of Chromatography A*, 1169, 31 - 39.

Becerril Elias, Lamas J. Pablo, Sanchez-Prado Lucia, Llompарт Maria, Lores Marta, Garcia-Jares Carmen, (2010) **Analysis of regulated suspected allergens in waters**, *Talanta* 83, 464 - 474.

Becerril-Bravo Elias, Lamas J. Pablo, Sanchez-Prado Lucia, Lores Marta, Garcia-Jares Carmen, Jimenez Blanca, Llompарт Maria (2010) **Ultrasound-assisted emulsification–microextraction of fragrance allergens in water**, *Chemosphere* 81, 1378 - 1385.

Garcia-Jares Carmen, Becerril Elias, Sanchez-Prado Lucia, Lamas J. Pablo, Dagnac Thierry, Llompарт Maria, (2012) **Ultrasound-assisted emulsification–microextraction for the analysis of several high production volume chemicals in environmental waters**, enviado para su publicación a *Analytica Chimica Acta*.

Otras publicaciones

Duran Juan Carlos, Becerril-Bravo Elías, Silva Castro Vanessa, Jiménez-Cisneros Blanca, Gibson Richard, (2009) **The analysis of a group of acidic pharmaceuticals, carbamazepine, and potential endocrine disrupting compounds in wastewater irrigated soils by gas chromatography – mass spectrometry**, *Talanta* 78, 1159 - 1166.

Regueiro Jorge, Becerril Elías, García-Jares Carmen, Llompart María, (2009) **Trace analysis of parabens, triclosan and related chlorophenols in water by headspace solid-phase microextraction with in situ derivatization and gas chromatography-tandem mass spectrometry**, *Journal of Chromatography A*, 1216, 4693 - 4702.



Determination of acidic pharmaceuticals and potential endocrine disrupting compounds in wastewaters and spring waters by selective elution and analysis by gas chromatography–mass spectrometry

Richard Gibson^{a,*}, Elías Becerril-Bravo^b, Vanessa Silva-Castro^b, Blanca Jiménez^b

^a Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 México, D.F., Mexico

^b Instituto de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 México, D.F., Mexico

Received 21 June 2007; received in revised form 22 August 2007; accepted 27 August 2007

Available online 30 August 2007

Abstract

Although the trend in development of analytical methods for emerging contaminants is towards reduced sample preparation and increased detector selectivity, there are still benefits from removal of matrix material during sample preparation. This paper describes a simple method for acidic pharmaceuticals and a range of potential endocrine disrupting compounds in untreated wastewaters and spring waters. It is based on separation of the two classes during elution from the extraction cartridge with final analysis by gas chromatography–mass spectrometry. 3,4-D was used as the recovery standard for the acids while 4-*n*-nonylphenol and [²H₄]estrone were used for the endocrine disrupters; mean recoveries varied between 89% and 111%. The method was also extensively validated by fortification with the target compounds. Recoveries of acids were from 68% to 97% with relative standard deviations generally less than 10% and recoveries of endocrine disrupters were 68–109% with relative standard deviations less than 20%. Detection limits varied from 0.005 to 1 ng/L in spring water, and from 0.5 to 100 ng/L in untreated wastewater. Concentrations of the analytes in the wastewater ranged from 0.018 to 22.4 µg/L. Values were comparable to reported data, although concentrations were generally relatively high, probably because of a lack of treatment. Triclosan, phthalates, estrone, 17β-estradiol, ibuprofen, and naproxen were present in the spring water from aquifers recharged indirectly with this wastewater after its use for irrigation; concentrations ranged from 0.01 to 25.0 ng/L. The much lower concentrations compared to wastewater indicate effective removal processes on passage through the soil and subsoil. © 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Estrogens; Pharmaceuticals; Phenols; Wastewater; Unplanned reuse

1. Introduction

Pharmaceuticals, personal care products, and potential endocrine disrupters are part of a large and diverse group of organic compounds, labelled as emerging contaminants, which have received much attention in recent years [1,2]. Many of these contaminants enter the environment by way of wastewater systems and their fate and the consequent environmental risks are only now being considered in detail through ecotoxicological studies [3]. This is partly due to the improved sensitivity of analytical techniques but also because reuse of wastewater is becoming more common worldwide, driven by pressure on other sources of fresh water [4]. One striking example of water

reuse, particularly because of its size and longevity, is in Mexico City where the wastewater from the metropolitan zone is sent almost entirely untreated via a drainage system to irrigate approximately 750 km² of farmland in the state of Hidalgo, close to the city. Intensive irrigation over many years has artificially recharged aquifers in the region and various springs have appeared in recent decades. These springs as well as direct extraction from the aquifers are the primary source of drinking water for the approximately 500 000 people living in the region [5] and the only treatment this water receives before consumption is chlorination. Exposure to organic contaminants is one of the possible risks from drinking this water [6,7].

The analysis of emerging contaminants is increasingly becoming the preserve of sophisticated analytical techniques such as liquid chromatography (LC) coupled to tandem mass spectrometry (MS–MS) detection. LC is well-suited to the many emerging contaminants that are relatively polar and non-volatile

* Corresponding author. Tel.: +52 56224336; fax: +52 56224352.

E-mail address: richard@igg.unam.mx (R. Gibson).

Table 1
Details of the use of the acids, characteristic ions, and retention times using the chromatographic conditions described

Compound	Use	Retention time (min)	Characteristic ions (<i>m/z</i>)		
Clofibrac acid	Metabolite of lipid regulator clofibrate	7.78	<u>143</u>	243	271
Ibuprofen	Analgesic and anti-inflammatory	7.97	<u>263</u>	264	
Salicylic acid	Metabolite of the analgesic aspirin	8.55	195	<u>309</u>	310
2,4-D	Pesticide	8.64	219	<u>277</u>	279
Gemfibrozil	Lipid regulator	9.60	179	<u>243</u>	307
Naproxen	Analgesic and anti-inflammatory	10.22	185	<u>287</u>	344
Ketoprofen	Analgesic and anti-inflammatory	10.90	295	<u>311</u>	312
Diclofenac	Antophlogistic	11.52	214	<u>352</u>	354
3,4-D	Recovery standard	8.77	251	<u>277</u>	279
2,3-D	Internal standard	8.88	219	<u>277</u>	279

and the powerful selectivity of MS–MS detection allows simple preparation methods for difficult matrices such as wastewaters [8,9]. However, this type of instrument is still not commonly available and there are opportunities for improvements in preparation that produce cleaner samples that can then be analyzed by techniques such as gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). Cleaner samples also have the advantage of reducing suppression of response, especially in LC–MS systems and increasing the number of injections possible between routine maintenance. An important consideration is that extra clean-up steps, which complicate preparation and add time and costs, should be avoided where possible. This paper describes the development of such a method for the analysis of acidic pharmaceuticals, potential endocrine disrupting compounds, and two pesticides in untreated wastewater and spring waters, using a simple extraction procedure with final analysis by GC–MS.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

All of the target acidic compounds, pesticides, and potential endocrine disrupters (listed in Tables 1 and 2) as well as the recovery standard 4-*n*-nonylphenol and internal stan-

dard [²H₁₆]bisphenol-A were available from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). 3,4-Dichlorophenoxyacetic acid (3,4-D) and 2,3-dichlorophenoxyacetic acid (2,3-D) were purchased from Riedel-de Haën (Seelze, Germany). The deuterated estrogens [²H₄]estrone, [²H₄]17β-estradiol and [²H₄]17α-ethinylestradiol were all obtained from Cambridge Isotopes (Andover, MA, USA). The derivatization agents *N*-*tert*-butyldimethylsilyl-*N*-methyltrifluoroacetamide (MTBSTFA) with 1% *tert*-butyldimethylsilylchlorane (TBDMSCI) and *N*,*O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) with 1% trimethylsilylchlorane (TMSCI) were also purchased from Sigma–Aldrich. All solvents used were HPLC grade, supplied by Burdick and Jackson (Morristown, NJ, USA). Oasis HLB extraction cartridges were purchased from Waters (Milford, MA, USA).

2.2. Sampling

The metropolitan zone of Mexico City covers approximately 1450 km² and has over 19 million inhabitants and tens of thousands of industrial units. All of the domestic and industrial wastewater, rainwater, and run-off from this area is mixed and sent via three drainage channels, the Emisor Central, the Interceptor Poniente, and the Gran Canal, directly to the irrigation

Table 2
Details of the use of the potential endocrine disrupters, characteristic ions, and retention times using the chromatographic conditions described

Compound	Use	Retention time (min)	Characteristic ions (<i>m/z</i>)		
4-Nonylphenols	Industrial chemical	7.30–7.70	193	207	<u>221</u>
Pentachlorophenol (PCP)	Pesticide	8.17	<u>323</u>	325	338
Triclosan	Antiseptic	9.43	<u>200</u>	360	362
Bisphenol-A	Industrial chemical	9.75	<u>357</u>	372	
Butylbenzylphthalate (BuBeP)	Plasticizer	9.60	91	<u>149</u>	206
Bis-2-ethylhexylphthalate (DEHP)	Plasticizer	10.22	<u>149</u>	167	279
Estrone	Natural estrogen	12.17	218	257	<u>342</u>
17β-Estradiol	Natural estrogen	12.45	285	<u>416</u>	
17α-Ethinylestradiol (EE2)	Artificial estrogen	13.45	285	<u>425</u>	440
4- <i>n</i> -Nonylphenol	Recovery standard	8.30	<u>179</u>	292	
[² H ₁₆]Bisphenol-A	Internal standard	9.72	<u>386</u>	368	217
[² H ₄]Estrone	Recovery standard	12.15	261	<u>346</u>	
[² H ₄]17β-Estradiol	Internal standard	12.43	420		
[² H ₄]17α-Ethinylestradiol	Internal standard	13.44	<u>429</u>	444	

region in the state of Hidalgo 70 km north of the city. The average flow rate is about 50 m³/s and there is no treatment process. Wastewater samples were taken in February and March 2007 from the Emisor Central, and on the same day water was collected from the Cerro Colorado spring, which first surfaced approximately 30 years ago (locations are shown in Fig. 1). Methanol (2%, v/v) was added and the samples transported surrounded by icepacks to the laboratory where they were stored at 4 °C and extracted within 24 h.

2.3. Sample preparation and method validation strategy

Initial work demonstrated that simple extraction of the wastewater using a C₁₈ or Oasis HLB cartridge followed by elu-

tion with either acetone or methanol generated a sample where an excess of matrix material caused interferences that made analysis by GC–MS for some of the target compounds difficult because of the presence of interfering organic compounds. In addition it was found that the same silylating reagent was not compatible for derivatization of acids and the other analytes. Using this information, the method was developed with separation of the acids from the rest of the analytes in mind. Method development focussed on optimising the separation of the acids, finding the appropriate solvent to elute the remaining analytes and choosing the silylating agent and conditions for derivatization. The method was validated by fortification of the acids at 10, 25, and 100 ng/L in spring water, and at 10, 25, and 50 µg/L in wastewater. The endocrine disrupters were fortified

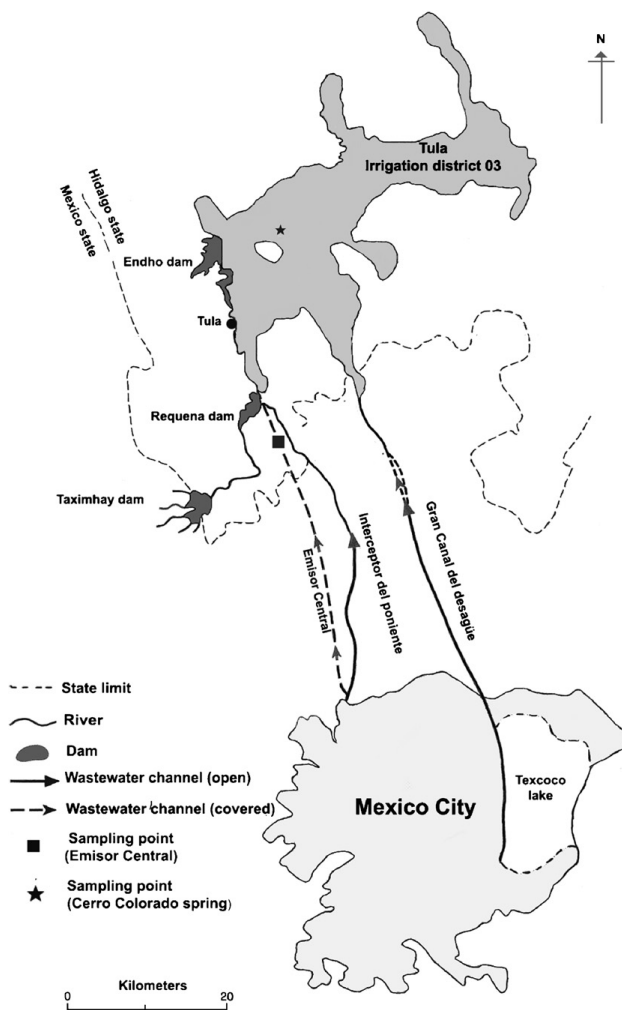


Fig. 1. Location of sampling points in relation to Mexico City.

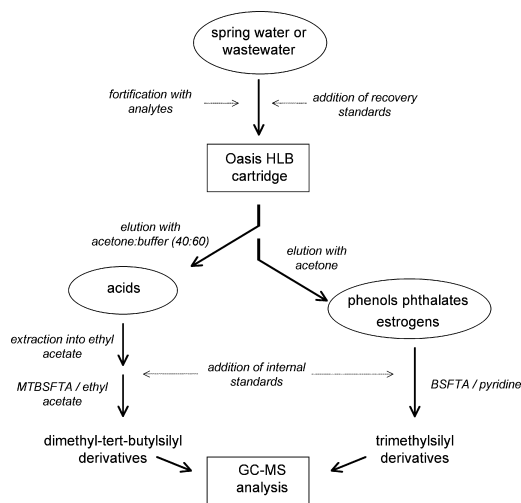


Fig. 2. Schematic representation of the analytical method.

at two concentrations in each water, dependent on the expected environmental concentrations; details are recorded in Table 5. A schematic representation of the final method is shown in Fig. 2.

2.4. Extraction

Spring or well water (3000 mL) was extracted unfiltered whereas wastewater (250 mL) was pre-filtered through a 1.2 μm glass fibre filter. Afterwards the samples were acidified to approximately pH 2 with sulphuric acid (98%) and fortified with the target compounds where appropriate. Finally recovery standards were added. In the case of spring water, amounts were 4-*n*-nonylphenol (100 ng), 3,4-D (100 ng), and [$^2\text{H}_4$]estrone (5 ng); for wastewaters 2000, 1000, and 20 ng, respectively. For each sample an Oasis HLB cartridge (200 mg) was conditioned with acetone (2×5 mL) followed by water (5 mL). The samples were then passed through the cartridge at a rate of approximately 10 mL/min using a gentle vacuum. On completion of the extraction, the cartridges were washed with HPLC grade water (2 mL) before being eluted with 5 mL of a 40:60 mixture of acetone:0.10 M sodium hydrogencarbonate buffer (adjusted to pH 10 using 1.0 M sodium hydroxide solution). This fraction contained the acidic compounds. The cartridge was then washed with 1 mL of acetone:water (25:75) and dried for 30 min under vacuum. The cartridge was finally eluted with 5 mL of acetone. This fraction contained the potential endocrine disrupters.

2.5. Derivatization procedures

The acid fraction was evaporated for 15 min under a stream of nitrogen to remove a proportion of the acetone present, acidified to below pH 2 with sulphuric acid, and the acids extracted into ethyl acetate (2×2 mL). Remnants of water were removed with anhydrous sodium sulphate, then 2,3-D added as an internal

standard (100 ng for spring water, 1000 ng for wastewater), and the sample was evaporated to dryness under a stream of nitrogen at room temperature. The residue was reconstituted in ethyl acetate then MSBSTFA added; volumes were 25 and 25 μL , respectively, for spring waters, 25 and 50 μL for wastewaters. *N*-tert-butyltrimethylsilyl derivatives were produced by reaction at 60 $^\circ\text{C}$ for 30 min. Spring water samples were injected directly into the GC-MS system, wastewaters after dilution to 1000 μL with ethyl acetate.

The acetone fraction was evaporated to approximately 200 μL then 1 mL of ethyl acetate added. Water was removed by addition of anhydrous sodium sulphate and [$^2\text{H}_{16}$]bisphenol-A (100 ng for spring water, 2000 ng for wastewater, [$^2\text{H}_4$]17 β -estradiol (5 and 20 ng, respectively), and [$^2\text{H}_4$]17 α -ethinylestradiol (5 and 10 ng, respectively) were added as internal standards. The sample was evaporated to dryness under a stream of nitrogen at room temperature. Pyridine and BSTFA were added, 10 and 25 μL , respectively, for the spring waters, 25 and 50 μL for the wastewaters. *N*-Trimethylsilyl derivatives were produced by reaction at 60 $^\circ\text{C}$ for 30 min before analysis by GC-MS. Spring water samples were injected directly, wastewaters again after dilution to 1000 μL with ethyl acetate. Occasionally, drying of the Oasis cartridges after extraction of wastewater was inefficient because of partial blocking of the frit. In these cases the acetone fraction contained more water than could be practically removed with anhydrous sodium sulphate. For these samples, the solution was evaporated to ~ 200 μL then ethyl acetate (2 mL) and water (2 mL) added and the analytes extracted into the organic phase after which evaporation proceeded as normal.

2.6. GC-MS analysis

The analytical instrument was an HP 6890 gas chromatograph, fitted with a 30 m HP5-MS fused silica capillary column (30 m \times 0.25 mm, 0.25 μm film thickness), and connected to an HP 5973 mass selective detector. The carrier gas was helium at a constant flow rate of 1.0 mL/min. A splitless injection technique was used to inject 1 μL of sample at an injection port temperature of 250 $^\circ\text{C}$. For the analysis of all compounds the oven programme was as follows: 100 $^\circ\text{C}$ for 1 min, 20 $^\circ\text{C}/\text{min}$ to 280 $^\circ\text{C}$, 280 $^\circ\text{C}$ for 10 min. The detector was used predominantly in selected ion mode (SIM). The electron impact source temperature was 230 $^\circ\text{C}$ with electron energy of 70 eV. The quadrupole temperature was 150 $^\circ\text{C}$, and GC interface temperature was 280 $^\circ\text{C}$. The instrument was tuned on perfluorotributylamine. Quantification and confirmation ions monitored are detailed in Tables 1 and 2. A scan range of 50–500 m/z was used for full scan analysis of selected samples.

3. Results and discussion

3.1. Sample preparation procedure

The Oasis HLB cartridge is a general purpose adsorbent used to isolate a wide range of organic compounds from aqueous samples. The adjustment to pH 2 with sulphuric acid assured that

the acids in particular were protonated for efficient adsorption. Many extraction methods for organic compounds using this type of adsorbent neglect to include a step to elute interferences and do not attempt separate elution of different classes of analytes. Although this has the advantage of simplicity, the disadvantage is the presence of more matrix material in the sample for injection in the chromatographic system. This can result in interfering peaks in the chromatogram, a more rapid deterioration in peak shape caused by contamination in the inlet system or GC column, or a faster reduction in sensitivity due to contamination of the ion source of the detector.

Some of the samples in the study reported here were untreated wastewaters, heavily loaded with organic material. Simple extraction using an Oasis HLB cartridge followed by elution with acetone and analysis by GC–MS produced chromatograms at times difficult to interpret due to an excess of interferences. In cases such as this, a time consuming extra clean-up step may be added but it was decided to take advantage of the opportunity to manipulate the sample on the cartridge, a step with little cost in time or solvent use. Organic acids were eluted first using a mixture of 0.10 M sodium hydrogencarbonate buffer at pH 10 and acetone (60:40). Conversion of the acids to their ionic form with buffer at pH 10 was not sufficient to completely overcome adsorption to the co-polymer and so a co-solvent was required. Preliminary studies showed that methanol was not suitable as only partial elution of some acids occurred whereas 40% acetone allowed recovery of all of each acid without any danger of eluting the other analytes. This acid fraction eluted most of the organic material (estimated by response in scan mode in the GC–MS system), much of which was subsequently eliminated by the extraction step into ethyl acetate.

The acid elution acted as an effective clean-up for the endocrine disruptors that remained on the cartridge, demonstrated by a comparison in scan mode where the acetone fraction

was much cleaner after a prior buffer:acetone elution (Fig. 3). Experiments with standards showed that it was then possible to elute the endocrine disruptors with either ethyl acetate or acetone, the former producing a cleaner final sample. It is of note that methanol, a solvent commonly used to elute these classes of compounds from these cartridges, recovered below 90% of several of the analytes and less than 70% of 4-nonylphenols. Acetone was finally chosen as the elution solvent because in the presence of the matrix material from untreated wastewaters less than 50% of bisphenol-A and 4-nonylphenols were recovered with ethyl acetate. This underlines that the behaviour of compounds in cartridges (or on any other chromatography material) can be profoundly affected by the presence of matrix material and development work should include work with real samples, not just standards. This difference may provide an explanation for a recent report of low recoveries of 4-nonylphenols from different waters [10].

Although there have been many investigations of the optimum amount of reagents to use for different derivatization processes (e.g. [11]), how these volumes affect detection limits are often not considered. For this study, low volumes of solvent and derivatizing agents were investigated (10–100 μ L) in order to achieve detection limits relevant to environmental concentrations, particularly for spring water. Consistent results were obtained at the final volumes chosen and this approach was used in preference to evaporation after derivatization which risked losses from volatilization. The derivatives produced by reaction of acidic pharmaceuticals with MTBSTFA produced better peak shapes and improved sensitivity in comparison to derivatization with BSTFA. Both derivatization methods were generally suitable for the phenols and estrone, but trimethylsilyl derivatives of 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol (EE2) were more sensitive than their *N-tert*-butyldimethylsilyl counterparts. In addition there is evidence that EE2 partially breaks down to estrone dur-

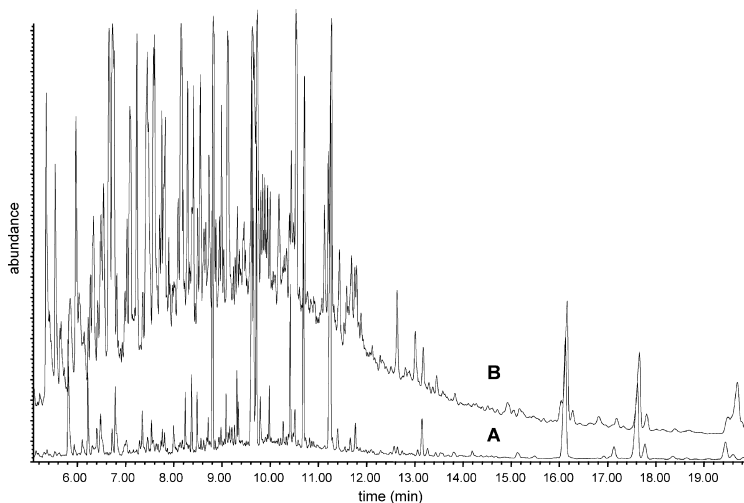


Fig. 3. Comparison of chromatograms (scan mode) of acetone elution (A) with prior acetone:buffer elution and (B) without prior acetone:buffer elution.

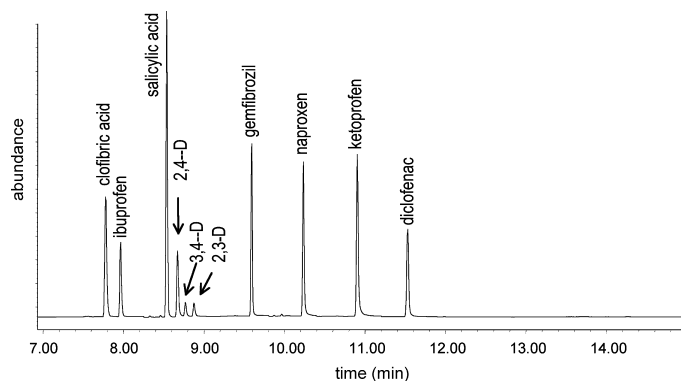


Fig. 4. Typical chromatography (SIM mode) of acid standards as *N*-tert-butylidimethylsilyl derivatives.

ing derivatization with MTBSTFA [12]. Hence the separation not only produced a much cleaner sample of the endocrine disrupters but permitted the flexibility to use a different derivatization procedure to optimize response in the GC–MS system. Typical chromatography of standards are shown in Figs. 4 and 5.

3.2. Linear correlation coefficients and limits of detection

The linearity of the instrument was acceptable for all analytes with correlation coefficients always greater than 0.99 in the concentration range of the study (Table 3). The limit of detection (LOD) of the method was defined as three times background (signal-to-noise ratio of 3) and any peak above the LOD was quantified (Table 3). LODs for the acids in spring water were between 0.25 and 1.0 ng/L, from 0.1 to 1.0 ng/L for the phenols, 0.5 ng/L for phthalates, and between 0.005 and 0.05 ng/L for the estrogens. These waters are not overly burdened with organic compounds and the limits for the phenols, phthalates and particularly the estrogens were dictated more by the sensitivity of the analytical instrument and the volume of water taken, less by

the matrix material present. The acid fraction was less clean and limits were dictated partly by background response of the matrix material in the samples. Untreated wastewaters are much more challenging to analyze. The LODs for the acids varied between 5 and 100 ng/L, for the phenols between 10 and 50 ng/L, was 50 ng/L for the phthalates, and varied from 0.5 to 2.5 ng/L for the estrogens. Limits were mostly determined by the smaller amount of water processed and the background generated by the organic material.

In general, LODs compare well with literature values for ground, surface and wastewaters [13,14]. The simple elution with buffer:acetone is key to avoiding further clean-up of the endocrine disrupter fraction and allows the use of the GC–MS for analysis of difficult samples like untreated wastewater at environmentally relevant LODs. For example the LODs for the estrogens were lower in this study for untreated wastewaters than reported recently for surface waters [12], lower than achieved in a method for treated wastewaters that additionally used a column clean-up [15] and comparable to that achieved using GC–MS–MS for final analysis [16].

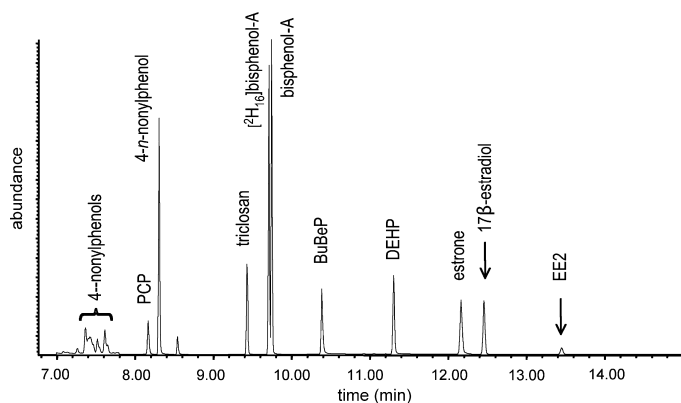


Fig. 5. Typical chromatography (SIM mode) of endocrine disrupters as *N*-trimethylsilyl derivatives.

Table 3
Limits of detection for the instrument (ng injected), spring water (ng/L) and wastewater (ng/L), and linear correlation coefficients (R^2)

Analyte	LOD			R^2
	IN	SW	WW	
Clofibric acid	0.01	0.50	100	0.998
Ibuprofen	0.01	0.25	50	0.993
Salicylic acid	0.005	0.25	5	0.999
2,4-D	0.01	0.50	100	0.994
Gemfibrozil	0.01	0.50	50	0.998
Naproxen	0.005	0.25	50	0.993
Ketoprofen	0.01	0.25	50	0.997
Diclofenac	0.01	1.00	50	0.995
4-Nonylphenols	0.025	1.0	50	0.996
PCP	0.010	0.2	20	0.994
Triclosan	0.010	0.1	10	0.996
Bisphenol-A	0.010	0.5	20	0.996
BuBeP	0.010	0.5	50	0.996
DEHP	0.010	0.5	50	0.997
Estrone	0.001	0.005	1	0.999
17 β -Estradiol	0.001	0.005	0.5	0.999
EE2	0.002	0.05	2.5	0.999

IN: instrument; SW: spring water; WW: wastewater.

3.3. Recovery data

The method was validated using two representative waters, spring water and untreated wastewater. Samples were fortified with the target analytes at least at two concentrations, the lower of which was as close as practical to a realistic environmental concentration. Details of recoveries for the acidic compounds are shown in Table 4. Average recoveries (excluding salicylic acid) in spring water ranged from 76 to 96% at a fortification of 5 ng/L, 87 to 97% at 25 ng/L, and 81 to 92% at 100 ng/L; relative standard deviations were generally less than 10%. In the wastewater recoveries varied from 68 to 114% at the lowest fortification (10 μ g/L), 70 to 90% at the intermediate level (25 μ g/L) and 77 to 113% at the greatest fortification (50 μ g/L); relative standard deviations were all under 10%. Recoveries and precision of the method were considered acceptable except for salicylic acid in spring water where it was probable that natural variations in the concentration of this acid led to high and variable recoveries. 2,3-D was considered a suitable internal standard for all of the acids.

Table 4
Recovery data (% \pm RSD) for target acidic compounds ($n=3$)

Analyte	Spring water fortification (ng/L)			Wastewater fortification (μ g/L)		
	(5)	(25)	(100)	(10)	(25)	(50)
Clofibric acid	82 \pm 5	92 \pm 6	92 \pm 8	68 \pm 2	70 \pm 2	77 \pm 2
Ibuprofen	96 \pm 3	97 \pm 5	88 \pm 8	76 \pm 4	78 \pm 3	85 \pm 2
Salicylic acid	293 \pm 39	139 \pm 47	107 \pm 63	114 \pm 9	90 \pm 8	113 \pm 4
2,4-D	91 \pm 5	96 \pm 6	88 \pm 7	81 \pm 4	78 \pm 3	81 \pm 3
Gemfibrozil	82 \pm 4	91 \pm 3	87 \pm 6	82 \pm 3	77 \pm 2	83 \pm 2
Naproxen	90 \pm 16	90 \pm 8	83 \pm 4	74 \pm 7	73 \pm 3	81 \pm 3
Ketoprofen	78 \pm 2	96 \pm 9	86 \pm 3	80 \pm 3	76 \pm 2	80 \pm 2
Diclofenac	76 \pm 4	87 \pm 8	81 \pm 2	84 \pm 4	80 \pm 3	94 \pm 2

Table 5
Recovery data (% \pm RSD) for target endocrine disrupting compounds ($n=3$)

Analyte	Spring water fortification ^a		Wastewater fortification ^b	
	(low)	(high)	(low)	(high)
4-Nonylphenols	109 \pm 18	108 \pm 15	81 \pm 12	75 \pm 10
PCP	94 \pm 8	101 \pm 11	32 \pm 5	27 \pm 16
Triclosan	93 \pm 11	100 \pm 6	95 \pm 11	85 \pm 19
Bisphenol-A	105 \pm 9	97 \pm 8	90 \pm 4	68 \pm 5
BuBeP	108 \pm 13	108 \pm 12	81 \pm 6	77 \pm 14
DEHP	104 \pm 1	75 \pm 21	–	124 \pm 6
Estrone	90 \pm 20	102 \pm 8	79 \pm 10	72 \pm 5
17 β -Estradiol	89 \pm 9	99 \pm 10	107 \pm 7	94 \pm 5
EE2	78 \pm 9	82 \pm 4	77 \pm 13	82 \pm 19

^a Fortification in spring water: 4-nonylphenols, bisphenol-A, BuBeP, and DEHP: 25 ng/L (low) and 100 ng/L (high); PCP, triclosan, and estrogens: 5 ng/L (low) and 25 ng/L (high).

^b Fortification in wastewater: 4-nonylphenols, bisphenol-A, BuBeP, and DEHP: 25 μ g/L (low) and 50 μ g/L (high); PCP and triclosan: 10 μ g/L (low) and 25 μ g/L (high); estrogens: 100 ng/L (low) and 2000 ng/L (high).

Distinct fortification concentrations were used for the different potential endocrine disruptors as natural concentrations in the waters were likely to vary greatly (Table 5). In the spring water recoveries ranged from 78 to 109% at the lower fortification and 82 to 108% at the higher fortification. In wastewater recoveries ranged from 77 to 107% at the lower and from 68 to 94% at the higher fortification with two exceptions. The environmental concentration of bis-diethylhexylphthalate (DEHP) in the wastewater was much greater than the higher fortification concentration (by 7- and 14-fold), making recovery data impossible to obtain at the lower fortification level and unreliable at the higher level. However, there was no DEHP present in the acid fraction, and recoveries were acceptable for the other phthalate butylbenzylphthalate (BuBeP). This, together with the consistent results obtained from the wastewater (see Section 3.4), suggest the method is reliable for DEHP. Recoveries of pentachlorophenol (PCP) were consistently around 30%. Several acid fractions were analysed for PCP and an average of 65% was recovered, accounting for the low recoveries obtained in the endocrine disrupter fraction. This suggests that PCP was partially adsorbed to matrix material in the wastewater that was eluted in the acid fraction, thereby causing concurrent partial elution of PCP. Although it would be possible to obtain recovery data from the two fractions, it was considered impractical

Table 6
Recovery data (% ±RSD) for the recovery standards

Sample	3,4-D	4- <i>n</i> -Nonylphenol	[² H ₄]estrone
Spring water			
Recovery (%)	111	96	104
RSD (%)	13	12	17
<i>n</i>	15	15	15
Wastewater			
Recovery(%)	89	95	94
RSD (%)	5	10	17
<i>n</i>	15	15	15

and therefore that the method was unsuitable for PCP in wastewater. This is a further indication of the differences that can occur between method development with standards and real samples. There were a wide range of compounds in the endocrine disrupter fraction and experiments showed that there were some minor differences in the extent of derivatization between compounds, dependent on the presence or absence of matrix material. Although these differences were not great and the two internal standards used were considered adequate, the result was greater variability in results and relative standard deviations that were acceptable but generally a little greater than for the acids.

3,4-D, 4-*n*-nonylphenol, and [²H₄]estrone were proposed as recovery standards to be added to all samples during future routine analysis and they were also added to the validation samples and recoveries determined (Table 6). Mean recoveries of 3,4-D, the recovery standard for the acids, were 111% in spring water and 89% in wastewater. Mean recoveries of 4-*n*-nonylphenol were 96% and 95%, respectively, while recoveries of [²H₄]estrone were 104% and 94%, respectively. Although the recoveries were generally slightly greater than for most of the analytes it was concluded that these compounds were suitable recovery standards for the procedure.

3.4. Concentrations of the analytes in blanks, spring waters, and wastewaters

Blank samples were included in each batch processed to assess contamination. Initial conditioning of the cartridges with acetone was important to remove general contamination and 4-nonylphenols in particular. For the acids, naproxen and salicylic acid were consistently present in concentrations above the LOD (Table 7). The expected contamination of blank samples with 4-nonylphenols and phthalates, most likely from solvents and the cartridge material, was controlled by consistent procedure. Contributions of concentrations in the blanks, relevant to the spring water but negligible compared to concentrations in the wastewater, were accounted for by subtraction in the calculation of all results.

As part of the validation procedure the concentrations of the analytes were measured on two occasions in the wastewater and spring water (Table 7). All of the acids except clofibrac acid were detected in the wastewaters. Concentrations were generally within the ranges reported for influents but greater than reported for effluents [17,18], although values for naproxen, an analgesic widely used in Mexico, were greater than reported data and salicylic acid was very variable. 4-Nonylphenols (22.4 and 11.0 µg/L) and DEHP (702 and 356 µg/L) were the most prominent potential endocrine disrupters in the wastewater. Mean concentrations of triclosan, bisphenol-A, and BuBeP varied between 0.66 and 2.50 µg/L while the concentrations of estrone and 17β-estradiol were 80 and 44 ng/L, and 22 and 17 ng/L, respectively. Again these values generally fall within the ranges reported for wastewaters [18,19]. It was noted that the concentration of the potential endocrine disrupting chemicals in the second sampling of wastewater were approximately half that of the first. First thoughts suggested a dilution of the wastewater by unseasonal rainfall in the city but the concentrations of acids were similar in the two samples except for diclofenac, suggest-

Table 7
Concentrations of acidic pharmaceuticals and potential endocrine disrupters in blanks, spring water and wastewater

Analyte	Blanks ^a (ng/L)	Wastewater (µg/L)		Spring water (ng/L)	
		Sampling 1	Sampling 2	Sampling 1	Sampling 2
Clofibrac acid	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Ibuprofen	<LOD	4.38 (±0.62)	5.09 (±1.20)	2.2 (±1.2)	0.8 (±0.3)
Salicylic acid	2.4	0.62 (±0.14)	29.06 (±25.18)	7.8 (±2.1)	9.6 (±12.2)
2,4-D	<LOD	0.37 (±0.03)	<LOD	<LOD	<LOD
Gemfibrozil	<LOD	0.68 (±0.13)	0.64 (±0.08)	<LOD	<LOD
Naproxen	0.40	15.22 (±1.76)	16.65 (±3.48)	0.8 (±0.2)	0.9 (±0.03)
Ketoprofen	<LOD	0.48 (±0.14)	0.26 (±0.07)	<LOD	<LOD
Diclofenac	<LOD	1.72 (±0.38)	6.36 (±0.38)	<LOD	<LOD
4-Nonylphenols	3.7	22.4 (±3.3)	11.0 (±1.1)	8 (±2)	1.8 (±2.3)
PCP	<LOD	–	–	<LOD	<LOD
Triclosan	0.13	2.04 (±0.29)	0.66 (±0.04)	1.3 (±0.2)	1.12 (±0.16)
Bisphenol-A	0.20	2.50 (±0.36)	0.77 (±0.05)	0.4 (±0.17)	0.41 (±0.21)
BuBeP	0.60	1.24 (±0.14)	0.71 (±0.05)	2.0 (±1.2)	1.7 (±0.4)
DEHP	14.5	702 (±49)	356 (±55)	25 (±3)	6.6 (±3.6)
Estrone	0.005	0.080 (±0.013)	0.044 (±0.001)	0.17 (±0.02)	0.16 (±0.02)
17β-Estradiol	0.002	0.022 (±0.004)	0.018 (±0.003)	0.02 (±0.003)	0.01 (±0.003)
EE2	<LOD	<LOD	<LOD	0.06 (±0.02)	<LOD

^a LOD values for the blanks are based on spring water data.

ing some other influence. A more detailed study of the temporal variations in concentrations in this wastewater would be needed to attempt an adequate explanation.

Ibuprofen, naproxen, salicylic acid, triclosan, bisphenol-A, and both phthalates were detected in the spring water but at concentrations several orders of magnitude lower than in the wastewater, indicating efficient removal processes on passage through the soil. Estrone (0.17 and 0.16 ng/L) and 17 β -estradiol (0.02 and 0.01 ng/L) were also present, again at concentrations much less than in the wastewater. Trace concentrations of many classes of emerging contaminants have been reported in groundwater [20] although in two studies involving irrigation with wastewaters most potential contaminants, including some of the above, were below the LOD [21,22].

4. Conclusions

An analytical method was developed for acidic pharmaceuticals, potential endocrine disrupters and two pesticides in untreated wastewaters and spring waters. The method is robust, has practical limits of detection, and can be used to analyze untreated wastewater with GC–MS detection. The acid elution proved an effective and yet simple clean-up for the endocrine disrupters and could be useful in methods for analysis of these compounds by LC–MS, by potentially reducing the extent of suppression of response. The target compounds were measured in wastewaters from Mexico City and in spring waters from aquifers artificially recharged by use of the wastewater for irrigation. Concentrations of contaminants in the wastewater were comparable with reported data. Some of the analytes were detected in the spring water although concentrations were several orders of magnitude below those observed in the wastewater, suggesting that most contaminants were removed on passage of the wastewater through the soil and subsoil.

Acknowledgements

We would like to acknowledge the Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales and the CONACyT of the Mexican

government for funding this project (No. SEMARNAT-2002-01-0519).

References

- [1] M.D. Hernando, M. Mezcua, A.R. Fernández-Alba, D. Barceló, *Talanta* 69 (2006) 334.
- [2] J.P. Sumpter, *Toxicol. Lett.* 102–103 (1998) 337.
- [3] K. Fent, A.A. Weston, D. Caminada, *Aquat. Toxicol.* 76 (2006) 122.
- [4] G.W. Miller, *Desalination* 187 (2006) 65.
- [5] B. Jiménez-Cisneros, A. Chávez-Mejía, *Environ. Technol.* 78 (1997) 721.
- [6] M. Salgot, E. Huertas, S. Weber, W. Dott, J. Hollender, *Desalination* 187 (2006) 29.
- [7] B. Jiménez, A. Chávez, *Water Sci. Technol.* 50 (2004) 269.
- [8] M. Petrovic, M.D. Hernando, M. Silvia Díaz-Cruz, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 1067 (2005) 1.
- [9] C. Hao, X. Zhao, P. Yang, *Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 569.
- [10] G. Gatidou, N.S. Thomaidis, A.S. Stasinakis, T.D. Lekkas, *J. Chromatogr. A* 1138 (2007) 32.
- [11] I. Rodríguez, J.B. Quintana, J. Carpinteiro, A.M. Carro, R.A. Lorenzo, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 985 (2003) 265.
- [12] Z. Yu, S. Peldszus, P.M. Huck, *J. Chromatogr. A* 1148 (2007) 65.
- [13] T. Ternes, *Trends Anal. Chem.* 20 (2001) 419.
- [14] D. Fatta, A. Nikolaou, A. Achilleos, S. Meriç, *Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 515.
- [15] V. Ingrand, G. Herry, J. Beausse, M.-R. de Roubin, *J. Chromatogr. A* 1020 (2003) 99.
- [16] M. Carballa, F. Omil, J.M. Lema, M. Llombart, C. García-Jares, I. Rodríguez, M. Gomez, T. Ternes, *Water Res.* 38 (2004) 2918.
- [17] S.S. Verenitch, C.J. Lowe, A. Mazumder, *J. Chromatogr. A* 1116 (2006) 193.
- [18] H.-B. Lee, T.E. Peart, M.L. Svoboda, *J. Chromatogr. A* 1094 (2005) 122.
- [19] A.C. Johnson, H.-R. Aerni, A. Gerritsen, M. Gilbert, W. Giger, K. Hylland, M. Jürgens, T. Nakari, A. Pickering, M. Suter, A. Svensen, F.E. Wettstein, *Water Res.* 39 (2005) 47.
- [20] T. Heberer, *Toxicol. Lett.* 131 (2002) 5.
- [21] M. Rabiet, A. Togola, F. Brissaud, J.-L. Seidel, H. Budzinski, F. Elbaz-Poulichet, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 5282.
- [22] T.A. Ternes, M. Bonerz, N. Herrmann, B. Teiser, H.R. Andersen, *Chemosphere* 66 (2007) 894.



Analysis of regulated suspected allergens in waters

Elias Becerril, J. Pablo Lamas, Lucia Sanchez-Prado, Maria Llompart, Marta Lores, Carmen Garcia-Jares*

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Química, Universidad de Santiago de Compostela, E-15782 Santiago de Compostela, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 May 2010
Received in revised form 7 September 2010
Accepted 25 September 2010
Available online 28 October 2010

Keywords:

Suspected fragrance allergens
Solid-phase microextraction
Gas chromatography–mass spectrometry
Water analysis

ABSTRACT

Fragrance suspected allergens including those regulated by the EU Directive 76/768/EEC have been determined in different types of waters using solid-phase microextraction (SPME) and gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). The procedure was based on headspace sampling (HS–SPME) using polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS/DVB) fibers and has been optimized by an experimental design approach. The method performance has been studied showing good linearity ($R \geq 0.994$) as well as good intra-day and inter-day precision ($RSD \leq 12\%$). Detection limits ($S/N = 3$) ranged from 0.001 to 0.3 ng mL⁻¹. Reliability was demonstrated through the quantitative recoveries of the compounds in real water samples, including baby bathwaters, swimming pool waters, and wastewaters. The absence of matrix effects allowed quantification of the compounds by external aqueous calibration. The analysis of 35 samples of different types of waters showed the presence of suspected allergens in all the analyzed samples. All targets were found in the samples, with the exception of methyl eugenol and amyl cinnamic alcohol. Highest concentrations of suspected allergens were present in baby bathwaters, containing from 5 to 15 of the compounds at concentrations ranging from few pg mL⁻¹ to several hundreds of ng mL⁻¹.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Fragrances are a group of chemicals incorporated in most cosmetic and other personal care products including baby care ones. The Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products (SCCNFP), currently known as the Scientific Committee on Consumer Products (SCCP), has identified 26 of these ingredients as likely to cause contact allergies [1,2]. Twenty-four of these suspected allergens are able to be analyzed by GC, whereas the other two are not single compounds but very complex natural extracts (oak moss and tree moss) unsuitable for GC. The European Cosmetic Directive requires an indication of the presence of potential fragrance allergens in cosmetic products if the limits of 0.01% and 0.001% for rinse-off and leave-on products, respectively, are exceeded [3].

Among products for baby care, those intended for the bath such as shampoos, bubble baths, shower gels, and soaps, contain detergents that can break down the natural barrier of the skin, allowing other irritants and allergens to penetrate. In the developed countries the daily baby bath is a common practice, and babies and kids

usually expend long time in the bath playing with toys. During bath, the exposure of children to chemicals is not only through dermal absorption, but also inhalation and ingestion can play an important role.

Swimming pools have been recently recognized as important sources of exposure to pollutants. Epidemiologic studies have shown increased risk of asthma both in indoor and outdoor pools [4]. In the case of suspected allergens, they can be easily transferred to the pool water since they are present in all kind of cosmetics and sun creams.

Some of the suspected allergens do not only pose the risk of causing contact allergies, but also systemic effects [5]. On the contrary, methyl eugenol that had been included in 2002 in the list of forbidden substances in the EU Cosmetic Directive [6] due to the potential risk of inducing cancer [7] has been recently incorporated to the regulated list of compounds to be used as fragrance components [3].

Analytical methods for the determination of this group of substances are mainly based on gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) [8–11]. To overcome difficulties on obtaining good resolution between compounds and with other matrix components, especially in cosmetic samples, several methods based on multidimensional chromatography have been proposed [12,13].

The suitability of solid-phase microextraction (SPME) for the analysis of suspected allergens has been recently demonstrated [14]. The proposed procedure allowed the reliable determination of 15 selected fragrance ingredients frequently found in baby bath-

* Corresponding author. Tel.: +34 981563100x14394; fax: +34 981595012.

E-mail addresses: jbecerril@iingen.unam.mx (E. Becerril), juanpablo.lamas@usc.es (J.P. Lamas), lucia.sanchez@usc.es (L. Sanchez-Prado), maria.llompart@usc.es (M. Llompart), marta.lores@usc.es (M. Lores), carmen.garcia.jares@usc.es (C. Garcia-Jares).

waters. A SPME followed by GC–MS method was also developed by Masuck et al. [15] to determine the emission of several fragrance allergens released from scented toys into ambient air.

The aim of the present study is to develop a general procedure based on solid-phase microextraction (SPME) with gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) for the analysis of fragrance suspected allergens in water samples that include all the regulated compounds amenable by GC. Since these compounds belong to diverse chemical families with a broad range of polarities and volatilities, optimization of the main variables affecting the SPME process has been performed using an experimental design approach. The SPME–GC–MS method has then been validated for the identification and quantification of 24 fragrance suspected allergens regulated in the EU Directive [3], as well as pinene and methyl eugenol. The method has been applied to baby bathwaters, swimming pool waters and wastewaters. Results demonstrated the presence of several of the target compounds in all samples and, in the particular case of baby bathwaters at concentrations of several hundreds of ng mL⁻¹ in some of the samples.

2. Experimental methods

2.1. Reagents and materials

3,7-Dimethyl-1,6-octadien-3-ol, 97% (linalool); 3,7-dimethyloct-6-en-1-ol, 95% (β-citronellol); 2-methoxy-4-prop-2-enyl phenol, 99% (eugenol); 1,2-dimethoxy-4-(2-propenyl)-benzene, 99% (methyl eugenol); 2H-1-benzopyran-2-one, 99% (coumarin); 3,7,11-trimethyldodeca-2,6,10-trien-1-ol, 95% (far-

nesol, mixture of isomers); 3,7-dimethylocta-2,6-dienal, 95% (citral, cis/trans); 1-methyl-4-prop-1-en-2-yl-cyclohexene 97% ((R)-(+)-limonene); 4-methoxybenzene methanol, 98% (anis alcohol); 2-methoxy-4-(1-propenyl) phenol, 98% (isoeugenol, cis/trans); 2-(phenylmethylene)-heptanal, 97% (amyl cinnamaldehyde); and 3-phenyl phenylmethyl ester-2-propenoic acid, 99% (benzyl cinnamate) were purchased from Aldrich (Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany).

2,6,6-Trimethylbicyclo[3.1.1]hept-2-ene, ≥99% ((-)-α-pinene); 3-methyl-4-(2,6,6-trimethyl-2-cyclohexen-1-yl)-3-buten-2-one, ≥85% (ionone); 3,7-dimethyl-2,6-octadien-1-ol, ≥96% (geraniol); 2-(phenylmethylene)-1-heptanol, ≥85% (amyl cinnamic alcohol); 3-(4-tert-butylphenyl)-2-methylpropanal, ≥95% (lilial); 4-(4-hydroxy-4-methylpentyl)cyclohex-3-ene-1-carbaldehyde, ≥97% (lyral); and 2-hydroxy-phenylmethyl ester benzoic acid, ≥99% (benzyl salicylate) were purchased from Fluka (Fluka Chemie GmbH, Steinheim, Germany).

2-Octynoic acid, methyl ester, ≥99% (methyl-2-octynoate); 7-hydroxy-3,7-dimethyloctanal, ≥95% (hydroxycitronellal); 3-phenyl-2-propenal, ≥93% (cinnamaldehyde); 2-(phenylmethylene) octanal, ≥95% (hexylcinnamaldehyde), were purchased from SAFC Supply Solutions (St. Louis, USA).

Benzene methanol, 99% (benzyl alcohol); 3-phenyl-2-propen-1-ol, 98% (cinnamyl alcohol); phenylmethyl benzoate, 98.5% (benzyl benzoate) was purchased from Chem Service (West Chester, USA).

Table 1 shows the chemical abstract service (CAS) registry numbers, IUPAC names, molecular formula, as well as the main physicochemical properties of the target compounds. Molecular structures are depicted in Fig. 1.

Table 1
CAS number, IUPAC names, molecular formula; and main properties of the studied allergens.

Key	Compound	CAS number	IUPAC name	Molecular formula	Molecular weight	log <i>K</i> _{OW}	Boiling point (°C)	Solubility ^a (mg/L)
1	Pinene	80-56-8	2,6,6-Trimethylbicyclo[3.1.1]hept-2-ene	C ₁₀ H ₁₆	136	4.37	155	18
2	Limonene	5989-27-5	1-Methyl-4-prop-1-en-2-yl-cyclohexene	C ₁₀ H ₁₆	136	4.57	176	13.8
3	Benzyl alcohol	100-51-6	Benzene methanol	C ₇ H ₈ O	108	1.05	205	40000
4	Linalool	78-70-6	3,7-Dimethylocta-1,6-dien-3-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	3.28	198	1589
5	Methyl-2-octynoate	111-12-6	2-Octynoic acid, methyl ester	C ₉ H ₁₄ O ₂	154	2.60	219	-
6	Citronellol	106-22-9	3,7-Dimethyloct-6-en-1-ol	C ₁₀ H ₂₀ O	156	3.38	225	322
7	Citral	5392-40-5	3,7-Dimethylocta-2,6-dienal	C ₁₀ H ₁₆ O	152	3.17	229	590
8	Geraniol	106-24-1	3,7-Dimethyl-2,6-octadien-1-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	3.28	229	531
9	Cinnamaldehyde	104-55-2	2-Propenal, 3-phenyl-	C ₉ H ₈ O	132	2.22	252	1420
10	Hydroxycitronellal	107-75-5	7-Hydroxy-3,7-dimethyloctanal	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	172	1.54	240	23800
11	Anis alcohol	105-13-5	Benzene methanol, 4-methoxy-	C ₈ H ₁₀ O ₂	138	1.10	259	2070
12	Cinnamyl alcohol	104-54-1	2-Propen-1-ol, 3-phenyl-	C ₉ H ₁₀ O	134	1.93	250	1800
13	Eugenol	97-53-0	2-Methoxy-4-prop-2-enyl-phenol	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	164	2.20	256	<1000
14	Methyl eugenol	93-15-2	Benzene, 1,2-dimethoxy-4-(2-propenyl)-	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	178	2.9	248	500
15	Isoeugenol	97-54-1	Phenol, 2-methoxy-4-(1-propenyl)-	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	164	2.45	267	984
16	Coumarin	91-64-5	2H-1-Benzopyran-2-one	C ₉ H ₆ O ₂	146	1.39	301	2500
17	Ionone	127-51-5	4-(2,6,6-Trimethyl-2-cyclohexen-1-yl)-3-methyl-3-buten-2-one	C ₁₄ H ₂₂ O	206	4.41	266	16
18	Lilial	80-54-6	3-(4-tert-Butylphenyl)-2-methylpropanal	C ₁₄ H ₂₀ O	204	4.07	279	33
19	Amylcinnamaldehyde	122-40-7	Heptanal, 2-(phenylmethylene)-	C ₁₄ H ₁₈ O	202	4.80	289	8.5
20	Lyral	31906-04-4	4-(4-Hydroxy-4-methylpentyl)cyclohex-3-ene-1-carbaldehyde	C ₁₃ H ₂₂ O ₂	210	2.53	319	185–1045
21	Amyl cinnamic alcohol	101-85-9	1-Heptanol, 2-(phenylmethylene)-	C ₁₄ H ₂₀ O	204	4.37	>200	26
22	Farnesol	4602-84-0	3,7,11-Trimethyldodeca-2,6,10-trien-1-ol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	5.31	283	267
23	Hexylcinnamaldehyde	101-86-0	Octanal, 2-(phenylmethylene)-	C ₁₅ H ₂₀ O	216	4.82	308	2.8
24	Benzyl benzoate	120-51-4	Phenylmethyl benzoate	C ₁₄ H ₁₂ O ₂	212	3.97	324	19.8
25	Benzyl salicylate	118-58-1	Benzoic acid, 2-hydroxy-, phenylmethyl ester	C ₁₄ H ₁₂ O	228	4.31	320	<1000
26	Benzyl cinnamate	103-41-3	2-Propenoic acid, 3-phenyl-, phenylmethyl ester	C ₁₆ H ₁₄ O ₂	238	3.65	371	9

^a Water, 298 K.

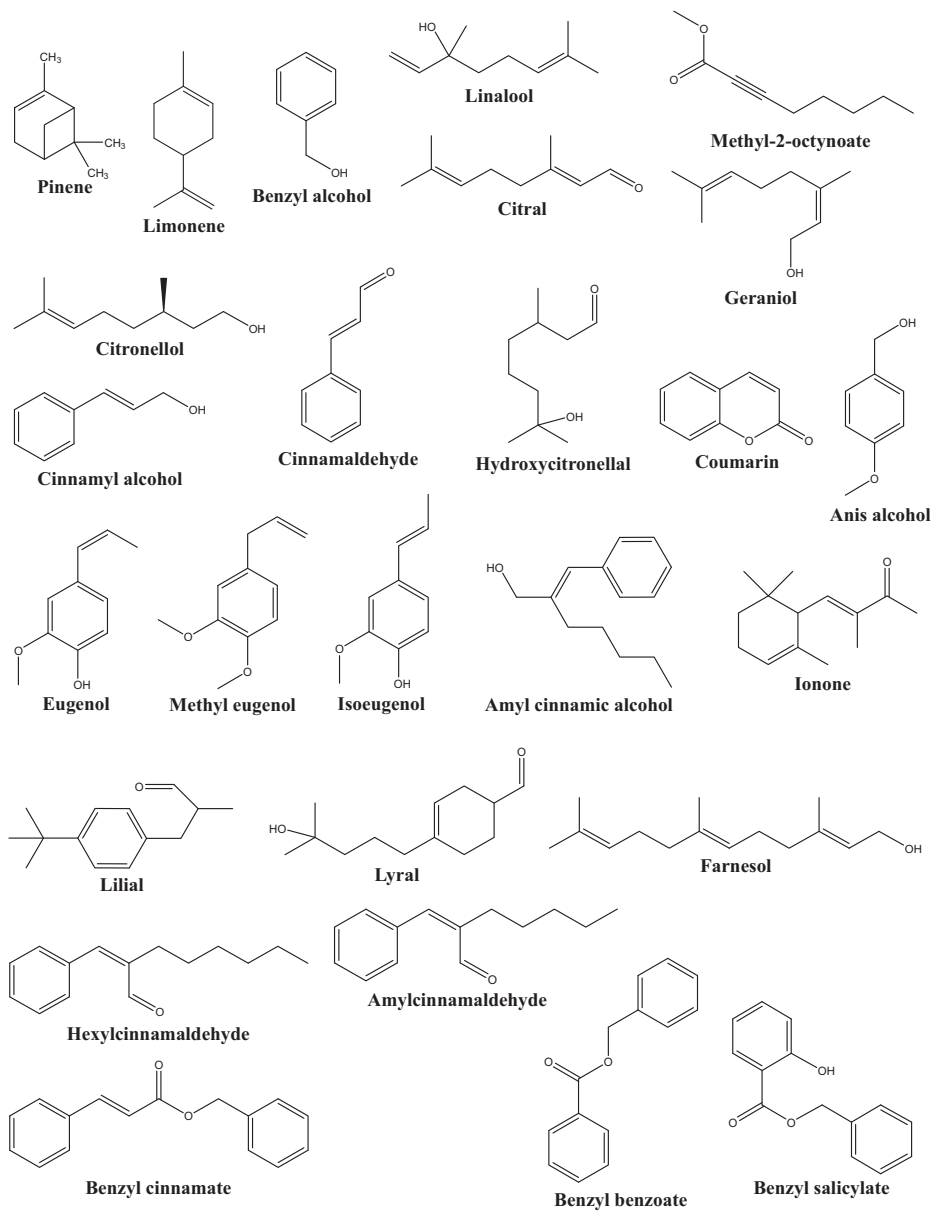


Fig. 1. Chemical structures of the considered fragrance compounds.

Methanol, ethyl acetate, and acetone were provided by Merck (Darmstadt, Germany). Individual stock solutions of each compound were prepared in methanol. Further dilutions and mixtures were prepared in acetone. The latter were employed for spiking water samples. Working solutions were made by appropriate dilution and then stored in amber glass vials at -20°C .

Sodium chloride was provided by VWR Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France). All solvents and reagents were of analytical grade. Ultrapure water was obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Billerica, MA, USA).

The SPME manual holders and $65\ \mu\text{m}$ polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS/DVB) fibers were supplied by Supelco

Table 2
Retention times, quantification and identification ions of the target compounds.

Key	Ret. time (min)	Compound	Quantification ions	Identification ions
1	6.66	Pinene	77,93	41,77,93,121
2	8.65	Limonene	67,93	39,67,93,136
3	8.95	Benzyl alcohol	77,79,108	77,79,108
4	9.84	Linalool	43,71,93	43,71,55,93
5	11.08	Methyl-2-octynoate	67,79,95	67,79,93,95
6	11.36	Citronellol	41,67,69	41,67,69,81
7	11.50	Citral	39,41,69	39,41,69,84
8	11.77			
9	11.87	Geraniol	41,69	41,69,93,123
10	11.87	Cinnamaldehyde	77,103,131	51,77,103,131
11	11.92	Hydroxycitronellal	43,59,71	41,43,59,71
12	11.97	Anis alcohol	77,109,138	77,109,137,138
13	12.14	Cinnamyl alcohol	78,91,92	78,91,92,134
14	12.47	Eugenol	164	103,131,164
15	12.78	Methyl eugenol	178	147,163,178
16	12.85	Isoeugenol	164	77,103,164
17	13.12			
18	13.16	Coumarin	118,146	89,118,146
19	13.28	Ionone	93,121,136	93,121,135,136
20	13.62	Lilial	189	131,147,189
21	14.16	Amylcinnamaldehyde	129	117,129,202
22	14.62	Lyrar	79,91,93	79,91,93,136
23	14.74	Amyl cinnamic alcohol	91,133	91,115,129,133
24	14.94	Farnesol	41,69	41,69,81,121
25	15.32	Hexylcinnamaldehyde	129,216	117,129,216
26	15.57			
27	15.64	Benzyl benzoate	105,194	77,91,105,194
28	16.94	Benzyl salicylate	91	39,65,91
29	20.75	Benzyl cinnamate	91,131	91,131,192

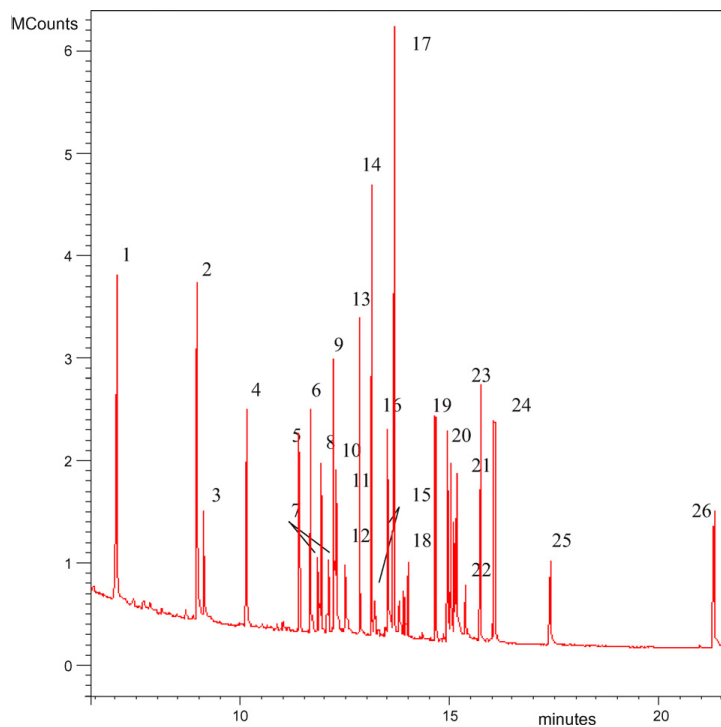


Fig. 2. GC-MS chromatogram obtained by direct injection of a standard mixture of the fragrance compounds at $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ in ethyl acetate (see number code equivalence in Table 1).

Table 3

Optimal conditions for the microextraction mode and temperature (HS, headspace, IM, immersion).

Key	Compound	Temperature (°C)	Extraction mode
1	Pinene	50.0	HS
2	Limonene	50.0	HS
3	Benzyl alcohol	50.0	IM
4	Linalool	66.8	HS
5	Methyl-2-octynoate	55.9	HS
6	Citronellol	86.3	HS
7	Citral	89.5	HS
8	Geraniol	92.8	HS
9	Cinnamaldehyde	57.4	IM
10	Hydroxycitronellal	53.7	IM
11	Anis alcohol	100	HS
12	Cinnamyl alcohol	50.0	IM
13	Eugenol	75.9	IM
14	Methyl eugenol	100	HS
15	Isoeugenol	81.7	HS
16	Coumarin	50.0	IM
17	Ionone	81.7	HS
18	Lilial	100	HS
19	Amylcinnamaldehyde	100	HS
20	Lyrall	100	IM
21	Amyl cinnamic alcohol	100	HS
22	Farnesol	100	HS
23	Hexylcinnamaldehyde	100	HS
24	Benzyl benzoate	100	HS
25	Benzyl salicylate	81.7	HS
26	Benzyl cinnamate	100	IM

(Bellefonte, PA, USA). Prior to first use, fibers were conditioned as recommended by the manufacturer.

Water samples were collected in amber glass containers. Sodium thiosulphate (0.1 mg mL^{-1}) was added to remove possible free chlorine. Samples were stored in the dark at 4°C until analysis.

2.2. Gas chromatography–mass spectrometry

The GC–MS analysis was performed using a Varian 450-GC gas chromatograph (Varian Chromatography Systems, Walnut Creek, CA, USA) coupled to an ion trap mass spectrometer Varian 240-MS with a waveboard for multiple MS (MS^n) analysis; equipped with an automatic injector CP-8400. The system was operated by Varian MS workstation v6.9.1 software.

Separation was carried out on a HP5 capillary column ($30 \text{ m} \times 0.32 \text{ mm i.d.}$, $0.25 \mu\text{m}$ film thickness) from Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA). Helium (purity 99.999%) was employed as carrier gas at a constant column flow of 1.0 mL min^{-1} . The GC oven temperature was programmed from 45°C (held 2 min) to 100°C at 8°C min^{-1} ; to 150°C at $20^\circ\text{C min}^{-1}$; to 200°C at $25^\circ\text{C min}^{-1}$; (held 5 min); and a final ramp to 233°C at 8°C min^{-1} (total analysis time = 22.5 min). The splitless mode (held 2 min) was used for injection, with the split flow at 20 mL min^{-1} . The injector temperature was kept at 220°C .

The ion trap mass spectrometer was operated in the electron impact (EI) ionization mode ($+70 \text{ eV}$) using an external ionization configuration. Manifold, ion trap, ion source and transfer line temperatures, were maintained at 40, 150, 200 and 280°C , respectively.

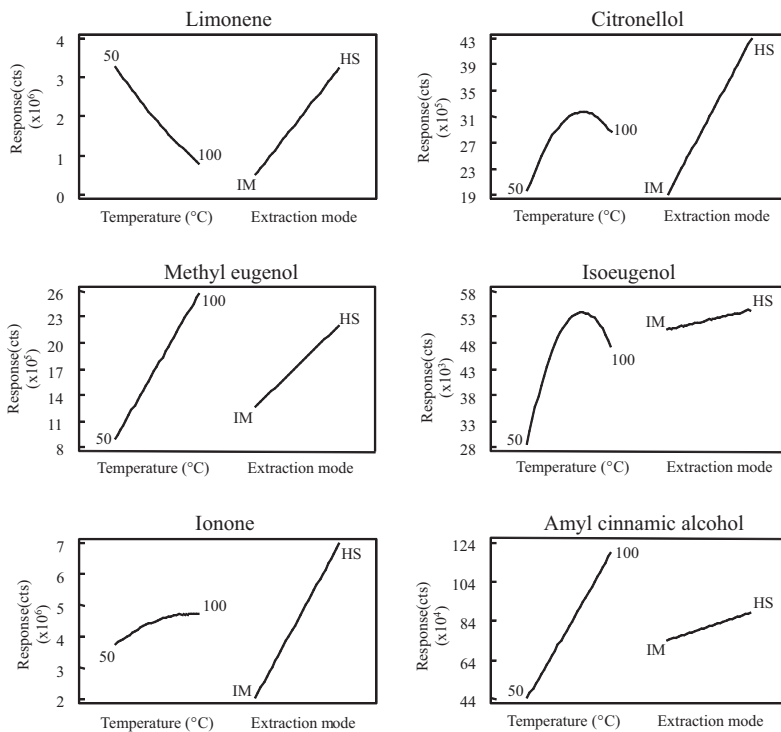


Fig. 3. Main effects plots for some selected compounds.

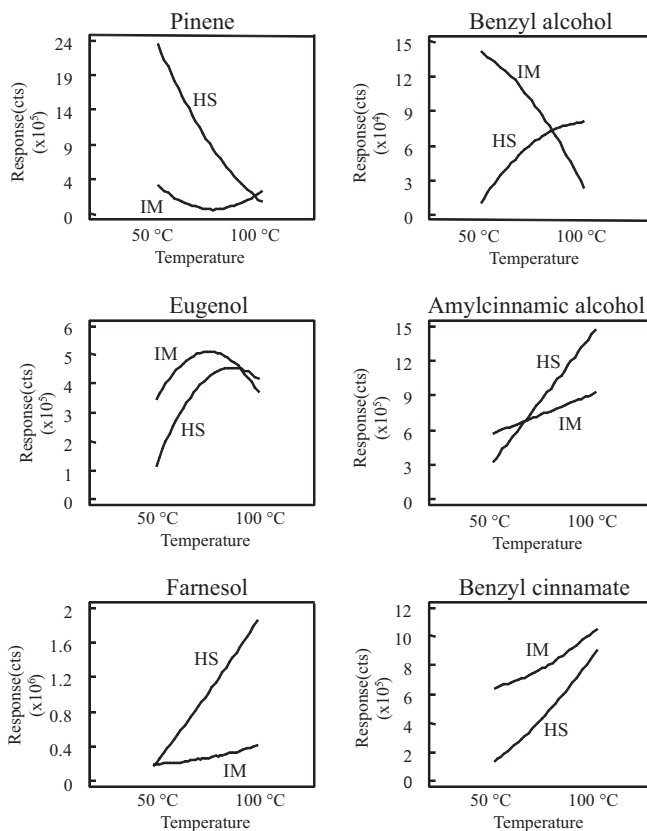


Fig. 4. Combined effect of factors for some selected compounds.

In the full scan mode the mass range was varied from 39 to 400 m/z at 3 μ scans, starting at 5 min and ending at 22.5 min. The filament emission current was 25 μ A. The analytes were positively identified by comparison of their mass spectra and retention times to those of standards. The identification and quantification ions, as well as the retention times for each target compound are listed in Table 2.

2.3. Solid-phase microextraction

Initial SPME conditions were optimized elsewhere [14]. In summary, aliquots of 10 mL water sample are placed in 22 mL headspace vials containing sodium chloride (2 g). Then, vials are sealed with aluminium caps furnished with Teflon-faced septa and immersed in a thermostated water bath. Samples are let to equilibrate for 5 min before the exposition of a DVB/PDMS fiber for 20 min. In the optimized procedure, samples are heated at 100 °C and extracted in the headspace mode. Magnetic stirring was performed during the extraction process. Once finished the exposition period, the fiber was retracted into the needle of the holder syringe and immediately inserted into the GC injector. Desorption was carried out at 220 °C for 5 min. Possible carryover was checked and under the selected conditions it was not observed. Blanks were periodically run during the analysis to confirm the absence of contamination.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of the analytical procedure

Difficulties described in literature due to the complexity of fragrance mixtures dealing with the effective separation and accurate determination of the 24 regulated suspected allergens [9,12,16] led to test different oven temperature programs in order to obtain a suitable chromatography of the compounds. First experiments also allowed the selection of the quantification ions to attain the maximum signal-to-noise ratio. In the GC–MS conditions summarized in Section 2, as well as in Table 2, all compounds could be determined in less than 21 min. The GC–MS instrumental linearity was evaluated by direct injection of the target analytes at different concentrations in ethyl acetate (1–50 μ g mL⁻¹, 2 μ L injection volume, 6 calibration levels). Linearity was good in the studied concentration range, with linear regression coefficients ranging from 0.993 to 0.999. Repeatability ($n = 5$) expressed in terms of relative standard deviation (RSD) was lower than 4.4%. Fig. 2 shows the chromatogram of a standard mixture of the 26 allergen fragrances at a concentration of 10 μ g mL⁻¹.

The suitability of the SPME technique for the determination of 15 fragrance allergens had been previously demonstrated, highlighting the importance of extraction mode and temperature in the

Table 4
Precision, linearity, and limits of detection and quantification of the method.

Compound	Intra-day precision (%RSD, n = 3)			Inter-day precision (%RSD, n = 5)			Linearity (R)	LOD (ng mL ⁻¹)	LOQ (ng mL ⁻¹)
	1 ng mL ⁻¹	5 ng mL ⁻¹	20 ng mL ⁻¹	5 ng mL ⁻¹	10 ng mL ⁻¹	20 ng mL ⁻¹			
Pinene	3.6	3.8	9.7	4.0	11	8.6	0.9963	0.10	0.35
Limonene	1.7	4.2	4.1	6.2	5.1	9.7	0.9993	0.006	0.021
Benzyl alcohol	2.8	5.7	1.0	9.7	13	11	0.9974	0.19	0.63
Linalool	2.2	7.8	1.0	6.4	12	4.6	0.9990	0.009	0.031
Methyl-2-octynoate	5.2	4.1	9.6	8.6	12	8.6	0.9960	0.13	0.42
Citronellol	4.2	5.4	0.8	8.7	7.9	6.5	0.9988	0.021	0.069
Citral	0.7	0.7	0.6	1.2	3.4	2.9	0.9982	0.042	0.14
Geraniol	3.5	8.9	0.7	6.6	5.3	2.5	0.9981	0.048	0.16
Cinnamaldehyde	2.1	4.7	1.0	7.7	12	4.3	0.9995	0.060	0.20
Hydroxycitronellal	8.9	5.7	3.6	4.3	11	3.7	0.9944	0.20	0.67
Anis alcohol	n.a.	4.7	7.1	3.6	11	6.0	0.9961	0.94	3.1
Cinnamyl alcohol	7.3	3.8	5.9	5.3	5.4	7.5	0.9997	0.14	0.46
Eugenol	8.9	5.5	2.8	6.5	6.6	3.9	0.9994	0.012	0.040
Methyl eugenol	0.9	1.4	2.7	2.5	2.7	7.3	0.9995	0.003	0.010
Isoeugenol	12	4.7	3.0	6.3	0.6	2.4	0.9963	0.038	0.13
Coumarin	2.7	4.6	4.3	7.1	7.7	3.7	0.9991	0.19	0.63
Ionone	1.9	3.8	0.9	7.0	2.5	0.8	0.9974	0.001	0.003
Lilial	2.4	5.3	1.6	4.8	4.8	3.0	0.9988	0.004	0.013
Amyl cinnamaldehyde	0.7	0.5	2.5	4.6	8.9	3.7	0.9998	0.001	0.004
Lyrar	n.a.	7.0	1.5	11	17	3.2	0.9998	1.1	3.6
Amyl cinnamic alcohol	4.0	4.6	0.8	5.9	5.5	4.3	0.9965	0.055	0.18
Farnesol	10	4.5	1.4	7.1	6.3	1.9	0.9996	0.30	1.0
Hexylcinnamaldehyde	7.8	5.2	2.5	4.0	8.8	3.3	0.9991	0.002	0.007
Benzyl benzoate	5.3	5.8	3.6	8.9	7.5	2.9	0.9989	0.003	0.010
Benzyl salicylate	6.3	3.2	7.6	11	3.2	9.2	0.9983	0.009	0.029
Benzyl cinnamate	2.3	1.3	6.8	12	15	5.3	0.9993	0.008	0.025

extraction efficiency [14]. Thus, the optimization of the SPME conditions for the simultaneous extraction of the 26 targets has been focused on these both parameters, and a multivariate strategy has been applied to account for possible second order effects. An experimental screening design 3×2 , which allowed to study temperature at three levels (50, 75 and 100 °C) and the two extraction modes (HS and direct SPME), has been selected. Experiments were performed using 10 mL aliquots of water spiked with the analytes at a concentration of 10 ng mL⁻¹. Sampling time was set at 20 min, sodium chloride was added in a proportion of 20%, and magnetic stirring was used to favour mass transfer in the aqueous media. Numerical analysis of data resulting from the experimental design was made with the statistical software package Statgraphics Centurion XV (Manugistics, Rockville, MD, USA).

The optimal conditions obtained for the 26 target compounds are summarized in Table 3. It can be seen that the extraction of 17 of the 26 compounds was favoured by high temperatures (>75 °C). The headspace extraction conditions are best suited for the most compounds, with only eight showing higher responses in the direct SPME mode.

Fig. 3 shows the main effect plots for several representative compounds. This kind of plots shows the main effects with a line drawn between the low and the high level of the corresponding factors. The length of the line is proportional to the effect magnitude of the factor in the extraction process, and the sign of the slope indicates the level of the factor that produces the highest response. The high influence on response of both extraction mode and temperature is clearly appreciated for most of compounds.

The most volatile compounds, pinene and limonene, are better extracted at 50 °C, while higher temperatures are needed as the boiling point of the compounds increases (see Table 3). This can be seen in Fig. 3, in which limonene, citronellol, isoeugenol, and methyl eugenol are examples of this tendency. Several exceptions are found regarding the extraction temperature: compounds such as benzyl alcohol, cinnamaldehyde, or coumarin are better extracted at the lowest temperature. Headspace extraction mode was generally better for the most of compounds, with some exceptions that are better extracted in the immersion mode (see Table 3).

Concerning the interaction between temperature and extraction mode, some results can be outlined (Fig. 4). Very high volatile compounds (pinene and limonene) must be extracted in the HS mode, and for these two compounds responses obtained at 100 °C are clearly low and independent of the extraction mode. A very different behaviour has been followed by benzyl alcohol or cinnamaldehyde, which are better extracted in the immersion mode but only if temperature is kept at 50 °C. If 100 °C is the temperature selected for the extraction, then the efficiency of the extraction is higher in the HS mode. Clear examples of compounds requiring the

Table 5
Percent recovery of the compounds from three different water samples spiked at 20 ng mL⁻¹ (baby bathwater), 5 ng mL⁻¹ (swimming pool water) and 10 ng mL⁻¹ (wastewater).

Compound	Bathwater	Swimming pool	Wastewater
Pinene	116 ± 11	100 ± 6	113 ± 11
Limonene	100 ± 7	85 ± 15	112 ± 7
Benzyl alcohol	106 ± 7	90 ± 12	78 ± 11
Linalool	90 ± 1	90 ± 3	81 ± 10
Methyl-2-octynoate	87 ± 3	115 ± 4	88 ± 7
Citronellol	83 ± 6	90 ± 3	85 ± 10
Citral	85 ± 2	101 ± 4	89 ± 5
Geraniol	104 ± 5	106 ± 6	96 ± 7
Cinnamaldehyde	88 ± 6	100 ± 4	103 ± 13
Hydroxycitronellal	99 ± 8	136 ± 8	110 ± 5
Anis alcohol	121 ± 5	117 ± 14	120 ± 10
Cinnamyl alcohol	103 ± 13	78 ± 1	106 ± 1
Eugenol	103 ± 5	107 ± 2	106 ± 15
Methyl eugenol	79 ± 5	104 ± 2	95 ± 7
Isoeugenol	96 ± 9	85 ± 3	80 ± 7
Coumarin	116 ± 1	107 ± 2	87 ± 10
Ionone	73 ± 1	91 ± 3	92 ± 1
Lilial	87 ± 2	83 ± 10	92 ± 3
Amyl cinnamaldehyde	86 ± 4	n.a.	85 ± 8
Lyrar	96 ± 4	107 ± 7	124 ± 17
Amyl cinnamic alcohol	88 ± 5	109 ± 9	98 ± 3
Farnesol	120 ± 12	78 ± 4	106 ± 15
Hexylcinnamaldehyde	88 ± 3	105 ± 2	84 ± 2
Benzyl benzoate	103 ± 6	103 ± 3	100 ± 2
Benzyl salicylate	122 ± 12	107 ± 9	122 ± 10
Benzyl cinnamate	79 ± 4	101 ± 7	108 ± 7

Table 6
Concentration (ng mL⁻¹) of the suspected fragrance allergens in water samples.

Compound	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8	W9	W10	W11	W12	W13	W14	W15	W16	W17	W18	W19	W20	W21	W22	
Pinene	0.57	0.10	0.03		2.6	0.41	0.24	0.08	0.55		1.1	1.8	8.6	0.42		5.5	1.7	28	37	1.1			
Limonene		1.3		14	43						845		56			30			152	12			0.07
Benzyl alcohol	8.6	0.28			1.4	0.38	0.76	12			13		47	4.5		12	8.0	6.7	361	59	6.4	0.15	
Linalool	2.0	1.8	3.1																3.5	1.8			
Methyl-2-octynoate	0.45	0.09		0.07		0.25	0.11	0.11	8.5	1.7	3.5	34	1.5	0.10		29	2.3		2.5	2.5	13	1.5	
Citronellol	1.9	1.4	8.9		8.8	3.0	4.8	4.8	1.0	0.40	0.50	0.82	0.65	0.64	41	1.4	4.0		6.3	2.1	1.0		
Citral	2.4								4.5		2.8		25			28	2.4		1.1	7.2	7.38		
Geraniol		0.28	0.35									1.5								4.5	29		
Cinnamaldehyde	4.4	1.7		1.7	6.5	16	8.7	12	2.5			103	20	31	177		5.1	25		4.5	29		
Hydroxycitronellal							8.3	13				122					0.80			6.1	7.0		
Anis alcohol							129		7.1			32	0.72				0.54					31	
Cinnamyl alcohol									3.8														
Eugenol		0.82																					
Isoeugenol									6.1												25		
Coumarin					0.61			0.02	4.1				11			43					5.9		
Linal	0.13		0.07	0.12	0.09	0.14	0.61	0.58	0.38	0.91		1.1		0.26	0.43	0.26	2.8	0.65	0.20	0.25		6.3	
Lilial																							
Farnesol		2.3			2.0	11	6.2	9.7	5.8	49	25	4.8	27	28	24	27	74	17	28	51	66	2.8	
Hexylcinnamaldehyde	0.19				3.0		0.34			0.50		0.22	0.21	29			0.21			0.11	0.12		
Benzyl benzoate					0.12				1.2		0.81		12					0.05	0.04	0.06	4.5	0.36	
Benzyl salicylate						0.12	5.9	0.40	0.19	0.03			4.1				1.7	0.71	0.38	0.42	1.2	0.07	
Benzyl cinnamate	0.04																						
Compound	W23	W24	W25	W26	W27	W28	W29	W30	W31	W32	W33	W34	W35										
Pinene	0.03	0.03		0.86	0.16														0.078	0.36		0.23	
Limonene																							
Benzyl alcohol																							
Linalool										0.051									0.21				
Methyl-2-octynoate																							
Citronellol														0.64									
Citral				0.19					0.044 ^a														
Geraniol																							
Cinnamaldehyde																							
Hydroxycitronellal									0.68														
Anis alcohol										1.80													
Cinnamyl alcohol																							
Eugenol									1.1	0.49					1.1								
Isoeugenol										0.051													
Coumarin												0.19											
Ionone	0.003	0.004								0.031		0.032		0.36							0.20	0.19	
Lilial	0.097	0.033			0.19		0.69		0.035	0.037		0.041	0.23	0.031						0.10	0.40	0.20	
Anyl cinnamaldehyde							0.050		0.022											0.066	0.11	0.20	
Lyrall																							
Farnesol																							
Hexylcinnamaldehyde	0.051				0.071		0.087		0.33 ^a														
Benzyl benzoate	0.070				0.033		0.074																
Benzyl salicylate																							
Benzyl cinnamate																							

Empty cell: not detected compound (<LOD).

^a Detected at concentration <LOQ.

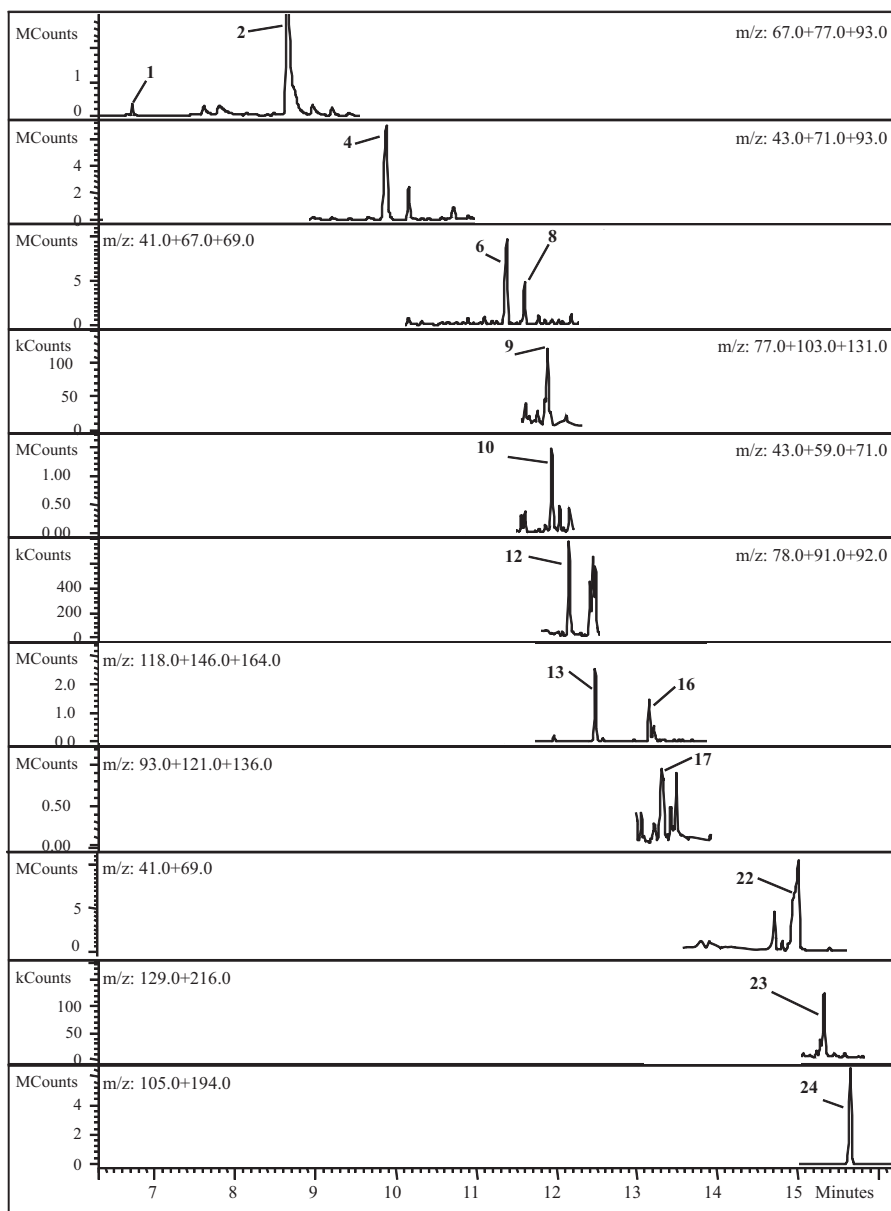


Fig. 5. HS-SPME-GC-MS extracted ion chromatograms for a baby bathwater sample (W13). For compound concentrations, see Table 6.

highest temperatures are amyl cinnamic alcohol and farnesol (see Fig. 4). This kind of compounds is extracted with very low efficiency at 50 °C independently of the extraction mode. It can be appreciated that for certain compounds the difference in efficiency between the direct and HS mode may be very short depending on temperature. Some examples are also depicted in Fig. 4. The optimal extraction conditions for eugenol were 75.9 °C and immersion (Table 3). Nev-

ertheless, its interaction graph shows that at higher temperatures the extraction efficiency is similar for both extraction modes. In the same way, benzyl cinnamate showed optimal conditions at 100 °C and immersion (Table 3), but the analysis of the interaction plot shows that the use of both extraction modes gives the best and quite similar responses at 100 °C; direct SPME is only better than HS-SPME if extraction is performed at 50 °C.

These all results allow concluding that the best conditions for the simultaneous determination of fragrance suspected allergens including all the regulated ones in waters imply HS-SPME at 100 °C.

3.2. Method performance study

Method linearity has been evaluated performing a calibration study in the experimental conditions. The calibration range was established from 0.01, 0.1 or 0.5 ng mL⁻¹ (depending on the individual limits of quantification) to 50 ng mL⁻¹, with 6–7 calibration levels. The method exhibited a direct proportional relationship between the extracted amount of each fragrance allergen and their initial concentration in the sample, with correlation coefficients (*R*) ranging from 0.994 to 1.000 (Table 4).

Precision of the experimental procedure was assessed at four concentration levels: 1, 5, 10, and 20 ng mL⁻¹. Results showed good intra-day and inter-day precisions, with relative standard deviation (RSD) values in general lower than 10% (see Table 4).

Limits of detection (LOD, signal-to-noise ratio of 3) and limits of quantification (LOQ, signal-to-noise ratio of 10) of the method are also presented in Table 4. These limits are at the sub-ng mL⁻¹, with two exceptions (anis alcohol and lylal), and therefore, the sensitivity of the proposed method can be considered satisfactory.

3.3. Application to water samples

The method was applied to the analysis of 35 water samples including 22 baby bathwater samples (W1–W22), 4 indoor swimming pool water samples (W23–W26), and 9 wastewaters (W27–W35). Three samples, a baby bathwater, a swimming pool water, and a wastewater, were selected for matrix effect and recovery studies.

Apparent recoveries were calculated as the ratio of the measured concentration, after subtracting the initial concentration in the non-spiked sample, to the spiked concentration, and expressed as percentage. Concentrations were calculated by external calibration using ultrapure water standards. Recoveries are shown in Table 5, and ranged from 80 to 120% for most compounds. These recoveries can be considered quantitative, and thus, no matrix effects were observed, allowing quantification by external water calibration.

The levels of the target compounds were then determined in a wide range of water samples. Baby bathwaters were obtained at homes from Galicia (Northwestern Spain) during the daily bath of children aged from few months to three years. The products employed for bath preparation, as well as the quantities were the usual and included shampoos, bubble baths and moisturising soaps all intended for babies. Wastewaters include two samples taken from the spill of a collective washing place (W27, W28), samples taken at the influent (W29–W31) and at the effluent (W32, W33) of sewage treatment plants, all in Galicia (Spain), as well as two samples taken at the central emissary of Mexico city (W34) and at Cerro Colorado (W35), both in Mexico, respectively.

Results of the analysis are shown in Table 6, and as can be seen, all target compounds were detected in the samples with the exception of amyl cinnamic alcohol and methyl eugenol. Compounds have been found at concentrations ranging from 0.003 to 845 ng mL⁻¹. It should be noticed that several bathwater samples showed high concentrations of several compounds, reaching values even greater than 100 ng mL⁻¹. The concentration levels found in wastewaters are in the range of those found for other widespread used fragrance compounds such as polycyclic musks in this kind of waters [17,18]. In swimming pool water samples, suspected aller-

gens were found at concentrations generally below 0.1 ng mL⁻¹, although these levels can be expected to increase in summertime. Fig. 5 shows the HS-SPME-GC–MS extracted ion chromatograms obtained for a baby bathwater sample.

The SPME-GC–MS proposed method showed good performance characteristics for the analysis of fragrance allergens, with low LODs allowing the sensitive determination in waters of 26 fragrance components including the 24 EU regulated suspected allergens, with low cost, simplicity and time-saving.

4. Conclusions

The combination of SPME and GC–MS was shown to be a simple and effective procedure for the determination of fragrance compounds including 24 regulated suspected allergens in waters.

The optimization of the extraction was carried out using experimental design showing that sampling mode and temperature were variables that highly influenced extraction efficiency. The optimal experimental conditions implied the use of PDMS/DVB coating for the extraction in the headspace mode at 100 °C.

The method was validated and demonstrated to be reliable and linear in the concentration range of interest. LODs were satisfactory (0.001–1.1 ng mL⁻¹) as well as reproducibility (RSD < 12%). Quantitative recoveries were obtained for targets in waters including wastewater (>80% for most compounds). The application of the method to water samples including baby bathwater, swimming pool waters and wastewaters, demonstrated the presence of suspected allergens in all samples. In baby bathwater some compounds were found at concentrations of several hundreds of ng mL⁻¹, while in wastewaters the concentration levels were in the range of those reported for other widespread fragrance components such as musks.

Acknowledgements

This research was supported by FEDER funds and project CTQ2010-19831/BQU from Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain. L.S.-P. and J.P.L. acknowledge Xunta de Galicia for a postdoctoral Angeles Alvarinho, and an Isabel Barreto contracts, respectively. E.B. thanks the Universidad Nacional Autónoma de México, Secretaría General, Dirección General de Asuntos del Personal Académico, for the award of a research scholarship.

References

- [1] SCCNFP/0017/98 Final FRAGRANCE ALLERGY IN CONSUMERS (December 1999).
- [2] Opinion concerning Oakmoss/Treemoss Extracts And Appropriate Consumer Information adopted by the SCCNFP during the 14th plenary meeting of 24 October 2000.
- [3] REGULATION (EC) No 1223/2009 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 30 November 2009 on cosmetic products (recast), Official Journal of European Union L342 (2009) 59.
- [4] C.P. Weisel, S.D. Richardson, B. Nemery, G. Aggazzotti, E. Baraldi, R.B. Ernest III, B.C. Blount, K.-H. Carlsen, P.A. Eggleston, F.H. Frimmel, M. Goodman, G. Gordon, S.A. Grinshpun, D. Heederik, M. Kogevinas, LaKind Judy S., M.J. Nieuwenhuijsen, F.C. Piper, S.A. Sattar, Environ. Health Persp. 117 (2009) 500.
- [5] T. Uehara, N. Kiyosawa, T. Shimizu, K. Omura, M. Hirode, T. Imazawa, Y. Mizukawa, A. Ono, T. Miyagishima, T. Nagao, T. Urushidani, Hum. Exp. Toxicol. 27 (2008) 23.
- [6] COUNCIL DIRECTIVE of 27 July 1976 on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products 76/768/EEC.
- [7] J.D. Johnson, M.J. Ryan, J.D. Toft, S.W. Graves, M.R. Hejtmancik, M.L. Cunningham, R. Herbert, K.M. Abdo, J. Agric. Food Chem. 48 (2000) 3620.
- [8] S.C. Rastogi, J.D. Johansen, T. Menné, P. Frosch, M. Bruze, K.E. Andersen, J.P. Lepoittevin, S. Wakeelin, I.R. White, Contact Dermatitis 41 (1999) 84.
- [9] H. Leijts, J. Broekhans, L. van Pelt, C. Mussinan, J. Agric. Food Chem. 53 (2005) 5487.
- [10] M. Bassereau, A. Chaintreau, S. Duperré, D. Joulain, H. Leijts, G. Loesing, N. Owen, A. Sherlock, C. Schippa, P.J. Thorel, M. Vey, J. Agric. Food Chem. 55 (2007) 25.
- [11] M. Niederer, R. Bollhalder, C. Hohl, J. Chromatogr. A 1132 (2006) 109.

- [12] M.S. Dunn, N. Vulic, R.A. Shellie, S. Whitehead, P. Morrison, P.J. Marriott, J. Chromatogr. A 1130 (2006) 122.
- [13] L. Mondello, A. Casilli, P.Q. Tranchida, D. Sciarrone, P. Dugo, G. Dugo, LC-GC Europe 21 (2008) 130.
- [14] J.P. Lamas, L. Sanchez-Prado, C. Garcia-Jares, M. Llompарт, Anal. Bioanal. Chem. 394 (2009) 1399.
- [15] I. Masuck, C. Hutzler, A. Luch, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 3136.
- [16] P.M.A.C. Robert Shellie, Flavour Frag. J. 19 (2004) 91.
- [17] A. Silva, J. Nogueira, Anal. Bioanal. Chem. 396 (2010) 1853.
- [18] C. García-Jares, M. Llompарт, M. Polo, C. Salgado, S. Macías, R. Cela, J. Chromatogr. A 963 (2002) 277.



Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chemosphere

Ultrasound-assisted emulsification–microextraction of fragrance allergens in water

Elias Becerril-Bravo^{a,b}, J. Pablo Lamas^a, Lucia Sanchez-Prado^a, Marta Lores^a, Carmen Garcia-Jares^a, Blanca Jimenez^b, Maria Llompart^{a,*}

^aDepartamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Química, Campus Sur, Universidad de Santiago de Compostela, E-15782, Santiago de Compostela, Spain

^bInstituto de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 México, DF, México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 June 2010

Received in revised form 9 September 2010

Accepted 9 September 2010

Keywords:

Fragrance allergens

Personal care products

Water analysis

Ultrasound-assisted extraction

Ultrasound-assisted emulsification–

microextraction

Factorial experimental design

ABSTRACT

A method based on ultrasound-assisted emulsification–microextraction (USAEME) and gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) has been developed for the analysis of regulated fragrance allergens in water. Extraction conditions such as the type of solvent, extraction temperature, irradiation time, and salting-out effect were optimized using a multivariate approach. Compounds were extracted during 2 min in an acoustically emulsified media formed by 100 μ L chloroform and 10 mL sample. The USAEME process provided an efficient and exhaustive extraction (enrichment factor \sim 100) and, after centrifugation, the extract was ready for GC analysis.

Validation was performed using spiked ultrapure water as well as other most complex matrices such as sewage water. Recoveries between 75% and 110% were generally obtained, and precision was characterized by RSD values $<$ 10% in most cases. The limits of detection (LODs) were at the sub-nanogram per millilitre level.

The proposed procedure was applied to the determination of allergens in several real samples including tap water, baby bathwater, recreational place water, public washing place water, and sewage water. The presence of some of the target compounds was confirmed in all the samples excluding tap water, demonstrating the ubiquity of this group of cosmetic and personal care products ingredients.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Most personal care products (PCPs) as well as many household products contain fragrances among their ingredients. The International Fragrance Association (IFRA) defines fragrances as any basic substance used in the manufacture of fragrance materials for its odorous, odour enhancing or blending properties. Fragrance ingredients may be obtained by chemical synthesis from synthetic, fossil or natural raw materials or by physical operations from natural sources (IFRA, accessed June 2010). The Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products (SCCNFP) has selected 26 compounds as likely to cause contact allergies (SCCNFP/0017/98, 1999). In the European Union (EU) these “suspected allergens” require labelling on cosmetic and detergent products (EU, 2009). The presence of these fragrances must be indicated in the list of ingredients when its concentration exceeds the 0.001% in leave-on products and 0.01% in rinse-off products. The most of these substances are also restricted by the IFRA (accessed June 2010), with the purpose of ensuring the safety of fragrance materials. Some may have a direct impact on the skin, eyes and mucous membranes, but they may also cross the skin and be

absorbed into the body. The long-term impact due to the possible bioaccumulation in human tissues is also cause of concern.

Although the main route of exposition to these cosmetic ingredients is, in general, the direct application of cosmetics on the skin, the contact with water containing these fragrances should be also considered. A recent study has analyzed the concentration of 15 fragrance allergens in baby bathwater showing quite high levels for some of them (Lamas et al., 2009). These compounds can also be present in recreational waters and so, skin can be extensively exposed to these and other chemicals through these waters (WHO, accessed June 2010).

As they are important components of daily use products, allergen fragrances are continuously introduced into the environment at high quantities, mainly via urban wastewater effluents. Bath waters as well as the residual waters from many residential communities enter the environment via direct spill into superficial waters or through disposal into the sewage treatment system, contributing to water pollution and causing environmental concern.

While analytical methods for fragrance allergens have been developed for cosmetics analysis (Rastogi et al., 1999; Leijts et al., 2005; Niederer et al., 2006; Bassereau et al., 2007) and, recently, to evaluate the levels of several fragrances on the skin treated with fortified cream (Sgorbini et al., 2010), to the best of our knowledge only one method has been reported for the determination of

* Corresponding author. Tel.: +34 981563100x14225.

E-mail address: maria.llompart@usc.es (M. Llompart).

fragrance suspected allergens in water samples (Lamas et al., 2009). This method based on solid-phase microextraction (SPME) has been applied to the analysis of several fragrance components in baby bathwaters. SPME is a solvent-free extraction technique that incorporates pre-treatment, concentration and sample introduction into a single procedure but this technique is non exhaustive, and calibration problems and possible matrix effects are drawbacks that must be considered.

The use of ultrasound energy in analytical chemistry has been generally applied to solid matrices (ultrasound-assisted extraction, UAE) (Capelo and Mota, 2005; Bossio et al., 2008; Pumure et al., 2010). Recently, the use of emulsions generated by ultrasound radiation has found interest in analytical chemistry. In this way, a microextraction technique for aqueous samples, known as ultrasound-assisted emulsification–microextraction (USAEME) has been proposed (Regueiro et al., 2008). This approach is based on the emulsification of a microvolume of organic extractant in an aqueous sample by ultrasound radiation and further separation of both liquid phases by centrifugation. The application of ultrasonic radiation accelerate the mass-transfer process between two immiscible phases, which together with the large surface of contact between both phases leads to an increment in the extraction efficiency in a minimum time. Thus, USAEME can be employed as a simple and efficient extraction and preconcentration procedure for organic compounds in aqueous samples. This technique was for the first time applied to the determination of synthetic musk fragrances, phthalate esters and lindane, and then it was reported its successful application to the determination in environmental waters of preservatives (Regueiro et al., 2009), polybrominated diphenyl ethers (Fontana et al., 2009), pesticides (Ozcan et al., 2009a; Chunhong et al., 2010), polychlorinated biphenyls (Ozcan et al., 2009b), and 2,4,6-trichloroanisole (Fontana and Altamirano, 2010). It has also been extended to the inorganic analysis (Ma et al., 2009).

The aim of the present work is to develop a method of USAEME with gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) for the analysis of regulated fragrance suspected allergens in water samples. One of the great advantages of USAEME versus other techniques such as SPME or single-drop microextraction (SDME) is that it can be considered as an exhaustive microextraction technique and, in consequence, quantification can be performed by standard calibration.

Optimization of the extraction conditions is achieved using a multifactorial experimental design approach. Validation of the method is performed in terms of accuracy, linearity, repeatability and limits of detection (LODs). To demonstrate the applicability of the proposed method, several real samples including baby bath waters, recreational pool waters, and waste waters, are analyzed.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and materials

3,7-Dimethyl-1,6-octadien-3-ol, 97% (linalool); 3,7-dimethyl-6-en-1-ol, 95% (citronellol); 2-methoxy-4-prop-2-enyl phenol, 99% (eugenol); 1,2-dimethoxy-4-(2-propenyl)-benzene, 99% (methyl eugenol); 2H-1-benzopyran-2-one, 99% (coumarin); 3,7,11-trimethyldeca-2,6,10-trien-1-ol, 95% (farnesol, mixture of isomers); 3,7-dimethylocta-2,6-dienal, 95% (citral, *cis/trans*); 1-methyl-4-prop-1-en-2-yl-cyclohexene 97% (limonene); 4-methoxybenzene methanol, 98% (anisyl alcohol); 2-methoxy-4-(1-propenyl) phenol, 98% (isoeugenol, *cis/trans*); 3-phenyl phenylmethyl ester-2-propenoic acid, 99% (benzyl cinnamate); and 2-(phenylmethylene)-heptanal, 97% (amyl cinnamal) were purchased from Aldrich (Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany).

3-Methyl-4-(2,6,6-trimethyl-2-cyclohexen-1-yl)-3-buten-2-one, $\geq 85\%$ (ionone); 3,7-dimethyl-2,6-octadien-1-ol, $\geq 96\%$ (geraniol); 2-(phenylmethylene)-1-heptanol, $\geq 85\%$ (amyl cinnamyl alcohol); 3-(4-tert-butylphenyl)-2-methylpropanal, $\geq 95\%$ (lilial); 4-(4-hydroxy-4-methylpentyl)cyclohex-3-ene-1-carbaldehyde, $\geq 97\%$ (lyral); and 2-hydroxy-phenylmethyl ester benzoic acid, $\geq 99\%$ (benzyl salicylate) were purchased from Fluka (Fluka Chemie GmbH, Steinheim, Germany).

2-Octynoic acid, methyl ester, $\geq 99\%$ (methyl 2-octynoate); 7-hydroxy-3,7-dimethyloctanal, $\geq 95\%$ (hydroxycitronellal); 3-phenyl-2-propenal, $\geq 93\%$ (cinnamaldehyde); 2-(phenylmethylene) octanal, $\geq 95\%$ (hexyl cinnamaldehyde), were purchased from SAFC Supply Solutions (St. Louis, USA). The internal standard PCB-30 (2,4,6-trichlorobiphenyl) was purchased as $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ solutions in isooctane from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany).

Benzene methanol, 99% (benzyl alcohol); 3-phenyl-2-propen-1-ol, 98% (cinnamyl alcohol); phenylmethyl benzoate, 98.5% (benzyl benzoate) was purchased from Chem Service (West Chester, USA).

Table 1 shows the CAS registry numbers, molecular weights, and main physicochemical properties of the target compounds.

Ethyl acetate, acetone, chloroform (CHCl_3) and sodium chloride were provided by Merck (Darmstadt, Germany). 1,1,1-Trichloroethane ($\text{C}_2\text{H}_3\text{Cl}_3$) was obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA) and carbon tetrachloride (CCl_4) was purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). All solvents and reagents were analytical grade.

Individual stock solutions of each compound were prepared in acetone and a standard mixture solution of all target compounds was prepared in acetone at a final concentration of about $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Different standard working solutions were obtained by appropriate dilution and stored in amber colored vials at -20°C .

Different real water samples were analyzed: tap water, baby bathwater, swimming pool and Spa pool water, public clothes washing place water, and residual treatment plant water (STP). STP water was filtrated through a $0.45 \mu\text{m}$ Millipore HA membrane filter (Billerica, MA, USA). The excess of free chlorine in the water samples was removed by addition of sodium thiosulphate (0.1mg mL^{-1}). All samples were stored in glass bottles at 4°C .

2.2. Ultrasound-assisted emulsification–microextraction (USAEME)

Aliquots of 10 mL sample were placed in 15 mL conical-bottom glass centrifuge tubes, which were previously cleaned. Under final optimized conditions, 2 g of NaCl, $100 \mu\text{L}$ of chloroform as extractant solvent and $10 \mu\text{L}$ of a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ solution of PCB-30 in hexane (internal standard) were added. The tube was then immersed into a 5 L-ultrasonic water bath Selecta Ultrasounds (Barcelona, Spain) in such a way that the level of both liquids (bath and sample) was the same. Extractions were performed at 40 kHz of ultrasound frequency and 100 W of power for 2 min at $25 \pm 3^\circ\text{C}$. As a result, oil-in-water (O/W) emulsions of chloroform (dispersed phase) in water (continuous phase) were formed. Emulsions were then disrupted by centrifugation at 3400 rpm for 10 min and the organic phase was sedimented at the bottom of the conical tube. Chloroform was removed by using a $100 \mu\text{L}$ Hamilton syringe (Reno, NV, USA) and transferred to a $100 \mu\text{L}$ glass insert located in a 1.8 mL gas chromatography vial. The thus obtained extracts were stored at -20°C until analysis by GC–MS.

2.3. Gas chromatography–mass spectrometry

The gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) analysis was performed using a Varian 450-GC gas chromatograph (Varian Chromatography Systems, Walnut Creek, CA, USA) coupled to an ion trap mass spectrometer Varian 240-MS (Varian Chromatography Systems) with a waveboard for multiple MS (MS^n) analysis;

Table 1
Physicochemical properties, retention times and selected ions of the target compounds.

Key	Retention time (min)	Compound	CAS number	Molecular weight	log K_{OW}	Boiling point (°C)	Solubility (mg L ⁻¹)	Quantifier and qualifier (m/z)
1	8.36	Limonene	5989-27-5	136	4.57	176	13.8	67, 93, 121
2	8.72	Benzyl alcohol	100-51-6	108	1.05	205	40 000	77, 79, 108
3	9.72	Linalol	78-70-6	154	3.28	198	1589	43, 93, 121
4	10.99	Methyl-2-octynoate	111-12-6	154	2.60	219	-	67, 79, 95
5	11.38	Citronellol	106-22-9	156	3.38	225	322	69, 81, 95
6	11.42	Citral	5392-40-5	152	3.17	229	590	39, 69, 109
7	11.59	Geraniol	106-24-1	154	3.28	229	531	41, 69, 111
8	11.82	Cinnamaldehyde	104-55-2	132	2.22	252	1420	77, 103, 131
9	11.87	Hydroxy-citronellal	107-75-5	172	1.54	240	23 800	43, 59, 81
10	12.00	Anisyl alcohol	105-13-5	138	1.10	259	2070	77, 109, 138
11	12.21	Cinnamyl alcohol	104-54-1	134	1.93	250	1800	77, 92, 134
12	12.43	Eugenol	97-53-0	164	2.20	256	<1000	103, 131, 164
13	12.71	Methyl eugenol	93-15-2	178	2.9	248	500	147, 163, 178
14	12.80	Isoeugenol	97-54-1	164	2.45	267	984	103, 131, 164
15	13.11	Coumarin	91-64-5	146	1.39	298	2500	89, 118, 146
16	13.21	Ionone	127-51-5	206	4.41	266	16	107, 135, 150
17	13.54	Lilial	80-54-6	204	4.07	279	33	131, 147, 189
18	14.36	Amyl cinnamal	122-40-7	202	4.80	289	8.5	115, 129, 202
19	14.54	Lylal	31 906-04-4	210	2.53	319	185-1045	79, 91, 136
20	14.73	Amyl cinnamyl alcohol	101-85-9	204	4.37	>200	26	91, 115, 133
21	14.54	Farnesol	4602-84-0	222	5.31	283	267	41, 69, 81
22	15.20	Hexylcinnamaldehyde	101-86-0	216	4.82	308	2.8	115, 129, 216
23	15.49							
24	15.52	Benzyl benzoate	120-51-4	212	3.97	324	19.8	105, 194, 212
25	16.79	Benzyl salicylate	118-58-1	228	4.31	320	<1000	65, 91, 228
25	20.59	Benzyl cinnamate	103-41-3	238	3.65	371	9	91, 131, 192

equipped with an automatic injector CP-8400. The system was operated by Varian MS workstation v6.9.1 software.

Separation was carried out on a HP5 capillary column (30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness) from Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA). Helium (purity 99.999%) was employed as carrier gas at a constant column flow of 1.0 mL min⁻¹. The GC oven temperature was programmed from 45 °C (held 2 min) to 100 °C at 8 °C min⁻¹, to 150 °C at 20 °C min⁻¹, to 200 °C at 25 °C min⁻¹ (held 5 min) and a final ramp to 225 °C (held 1 min) at 8 °C min⁻¹.

The injector was operated in the splitless mode and programmed to return to the split mode after 2 min from the beginning of a run. Split flow was set at 20 mL min⁻¹ and the injector temperature was kept at 260 °C.

The ion trap mass spectrometer was operated in the electron impact (EI) ionization mode (+70 eV) using an external ionization configuration. Manifold, ion trap, ion source and transfer line temperatures, were maintained at 40, 150, 200 and 280 °C, respectively.

In the full scan mode the mass range was varied from 39 to 400 m/z at 3 µscans, starting at 5 min and ending at 22.50 min. The filament emission current was 25 µA. The analytes were positively identified by comparison of their mass spectra and retention times to those of standards. The identification and quantification ions and retention times for each target compound are listed in Table 1.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of USAEME process

The chromatographic method for the separation of the target allergens was optimized elsewhere (Lamas et al., 2010) and it is described in the Experimental section. Table 1 summarizes the

retention times as well as the qualification and quantification ions of the target analytes.

Regarding the USAEME process, the selection of a suitable extractant is limited by several characteristics that are necessary for emulsification in the presence of ultrasonic radiation. Some of these characteristics are a higher density than water and low water solubility. The selected solvent must be compatible with the separation and detection technique and, therefore, a good gas chromatographic behavior is another desirable characteristic. Most of heavy solvents are halogenated compounds; several of them, were initially tested in order to evaluate the chromatographic performance, and the possible presence of interferences during mass spectrometry detection. Based on previous studies (Regueiro et al., 2008, 2009), carbon tetrachloride, chloroform, and 1,1,1-trichloroethane were initially selected. All of them demonstrated to be suitable for fragrance allergens GC-MS analysis, showing similar peak resolution. In addition, the responses obtained were equivalent for all target analytes.

First USAEME experiments were performed with aliquots of 10 mL of ultrapure water and 100 µL of solvent. The US irradiation time was 10 min. In all experiments, PCB-30 was used as internal standard to minimize possible problems resulting from lack of repeatability in the sedimented phase volume. Emulsification was observed with all three solvents. Organic phases were then separated by centrifugation and injected into the GC-MS system. Fig. 1 compares the chromatographic responses obtained by each one of the three solvents. As can be seen in the figure, the responses were equivalent for some analytes. Nevertheless, 10 of the target compounds presented very low response with carbon tetrachloride, and, in consequence, this solvent was discarded for further optimization.

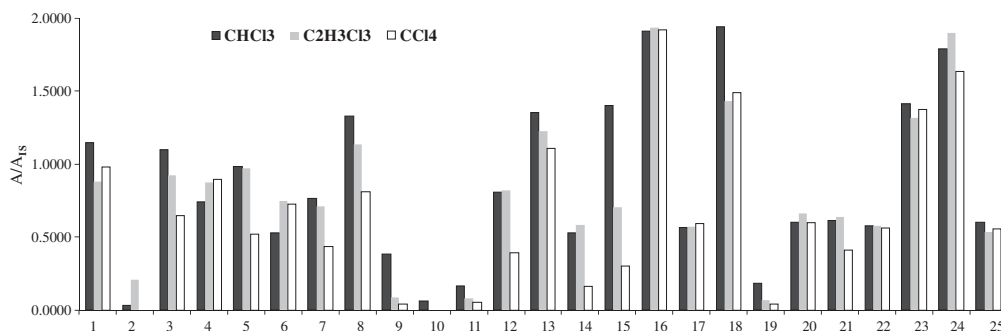


Fig. 1. Comparison of the chromatographic responses obtained by each one of the three solvents: chloroform (CHCl_3); 1,1,1-trichloroethane ($\text{C}_2\text{H}_3\text{Cl}_3$); and carbon tetrachloride (CCl_4).

3.2. Multifactor design study

The influence of the main variables potentially affecting the USAEME efficiency was evaluated by using a multifactorial screening design. The study consisted of a complete factorial 2^4 design, involving 16 randomized experiments and allowing 5 degrees of freedom to estimate the experimental error. This design has resolution V, which means that it is capable of evaluating all main effects and all two-factor interactions. Numerical analysis of data resulting from the experimental design was made with the statistical software package Statgraphics-Plus v5.1 (Manugistics, Rockville, MD, USA). Factorial design optimization was performed using aliquots of water spiked with the analytes at a concentration of 10 ng mL^{-1} .

The selection of an appropriate solvent is essential for all liquid–liquid extraction (LLE) – based processes. Chloroform and trichloroethane, preselected in previous experiments, were included in the experimental design optimization, in an attempt to achieve the highest extraction efficiency for the target compounds. Extraction time is usually an important factor in most extraction procedures. The effect of this factor was examined at 2 and 10 min. Temperature is other frequently important parameter, and was studied at two levels, 25°C and 50°C . Finally, the salting-out effect is frequently used in LLE, SPME and liquid phase microextraction (LPME) procedures. Generally, addition of salt can decrease the solubility of analytes in the aqueous phase, promoting the transfer towards the organic phase. Therefore, the concentration of sodium chloride in the aqueous solution was the last factor evaluated at two levels: 0% (no addition) and 20% (m/V). In brief, four variables were screened in this design, namely: extraction time (A), solvent (B), temperature (C), and sodium chloride concentration (D).

Numerical analysis of the results leads to the ANOVA results shown in Table 2. For the sake of simplicity, only the interaction factors that were significant in any case are included. As can be seen, the most important factors, with statistical significance for many of the target compounds, are the extractant and the concentration of sodium chloride. The temperature and the extraction time were in general not significant with few exceptions. Regarding the two-factor interactions, the only important effect was the one between the solvent and the concentration of sodium chloride (BD), which was statistically significant for 10 compounds.

The information included in the ANOVA can be graphically plotted by means of the Pareto charts. In Fig. 2, some representative graphics are included. In these graphics the length of each bar is proportional to the absolute value of its associated standardized effect. The standardized effect is obtained by dividing the estimated

effect of each factor or interaction by its standard error. Vertical line in the graphs represents the statistically significant bound at the 95% confidence level.

Other interesting graphic option provided by the statistic software is the main effects plot. Fig. 3a shows the main effects diagrams for several compounds. This kind of plots shows the main effects with a line drawn between the low and the high level of the corresponding factors. The length of the lines is proportional to the effect magnitude of each factor in the extraction process, and the sign of the slope indicates the level of the factor that produces the highest response. As commented above, solvent and concentration of sodium chloride were the most important factors and its influence is clearly appreciated in the plots. For most compounds higher extraction efficiency was observed when chloroform was used, although trichloroethane extraction was more favourable for six analytes, such as citral (see Fig. 3a). In general, the addition of NaCl affects positively the extraction of analytes (see some examples in the figure), excluding limonene (Fig. 3a), hexylcinnamaldehyde, and benzyl cinnamate. Regarding temperature and extraction time, these factors were not significant with a few exceptions, in which case better extraction was obtained at 25°C and 2 min.

The interaction of the most important main factors, solvent and addition of salt, was also significant for several analytes, being even the most important factor in some cases (e.g. benzyl alcohol, Fig. 2). This interaction is shown in Fig. 3b for some analytes. It can be appreciated how the addition of salt favours chloroform extraction but it does not benefit trichloroethane extraction.

In view of the results of the experimental design, the selected general conditions for the simultaneous ultrasound-assisted emulsification–microextraction of the target compounds from water samples were as follows: an extraction time of 2 min, chloroform as extractant, 25°C , and 20% sodium chloride.

3.3. Method performance: application to real samples

Due to the ubiquity of the target compounds, which are used in all kind of cleansing and cosmetics products, the risk of sample contamination is not negligible, so it is advisable to extreme precautions to avoid sources of interference in the laboratory environment. Blanks must be run very frequently to warranty the absence of contamination.

Analytical quality parameters were evaluated in order to assess the performance of the USAEME method.

Method linearity was tested by injecting chloroform standard solutions between $0.020 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Determination

Table 2
F ratios and p values obtained in the analysis of variance.

	Main effects								Interactions			
	A: time		B: solvent		C: temperature		D: % NaCl		BC		BD	
	F ratio	p value	F ratio	p value	F ratio	p value	F ratio	p value	F ratio	p value	F ratio	p value
Limonene	22	+	9	+	11	+	271	+	0.2		8	+
Benzyl alcohol	0.0		84	+	4		84	+	4		84	+
Linalol	2		1		1		43	+	2		0.0	
Methyl-2-octynoate	0.03		35	+	5		4		1		18	+
Citronellol	2		6		0.5		3		0.0		0.2	
Citral	0.1		80	+	2		7	+	5		24	+
Geraniol	5		84	+	2		48	+	1		0.1	
Cinnamaldehyde	0.3		19	+	23	+	126	+	0.01		1	
Hydroxycitronellal	0.3		479	+	0.2		1016	+	5		15	+
Anisyl alcohol	1		259	+	3		203	+	3		155	+
Cinnamyl alcohol	0.5		491	+	4		1068	+	10	+	123	+
Eugenol	0.4		8	+	31	+	65	+	0.1		3	
Methyl eugenol	0.5		3		4		1		0.01		0.1	
Isoeugenol	17	+	17	+	2		21	+	16	+	1	
Coumarin	0.3		533	+	97	+	262	+	21	+	0.4	
Ionone	5		83	+	6		1		1		30	+
Lilial	0.3		3		0.3		0.01		0.4		3	
Amyl cinnamal	0.3		5		0.1		6		0.01		0.3	
Lylal	2		320	+	10	+	275	+	5		35	+
Amyl cinnamyl alcohol	2		0.2		2		3		5		10	+
Farnesol	11	+	0.4		0.1		0.2		0.3		1	
Hexylcinnamaldehyde	1		0.4		14	+	7	+	0.0		3	
Benzyl benzoate	0.0		2		0.1		3		0.1		3	
Benzyl salicylate	0.0		27	+	0.1		2		0.03		2	
Benzyl cinnamate	0.1		3		0.4		9	+	0.2		0.3	

+ cell, p value < 0.05; empty cell, p value > 0.05.

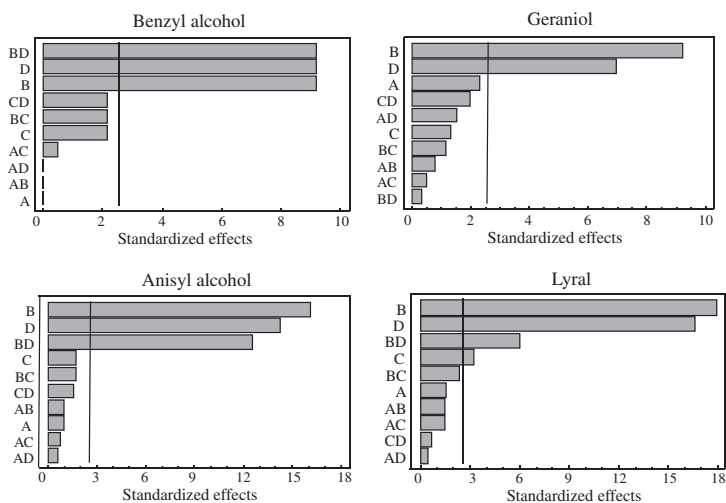


Fig. 2. Pareto charts showing the significant factors (95%) for some selected fragrance allergens (see factor codes in Table 2).

coefficients (R^2) between 0.9974 and 1.0000 were obtained for all compounds (Table 3).

Recoveries were evaluated using milliQ water spiked at four concentrations from 0.5 ng mL⁻¹ to 100 ng mL⁻¹. They were calculated by dividing the difference between the measured concentrations for spiked and non-spiked samples by the concentrations of the compounds added. The thus obtained values can be considered satisfactory, generally between 70% and 110%, excluding 3 of the 25 target analytes, limonene, benzyl alcohol, and anisyl alcohol. For these last compounds, recoveries were very low, with average

values of 18%, 20% and 27%, respectively (Table 3). Precision of the experimental procedure was also evaluated at several concentration levels by calculating the relative standard deviation (RSD). These results are also shown in the table, and they were lower than 10% in most cases. LODs (signal-to-noise ratio of 3) are also presented, and all of them were below 1 ng mL⁻¹ with the exception of anisyl alcohol.

The aim of the present work is to develop a methodology suitable for the analysis of the target compounds in different kinds of water samples and, consequently, it is necessary to evaluate possible

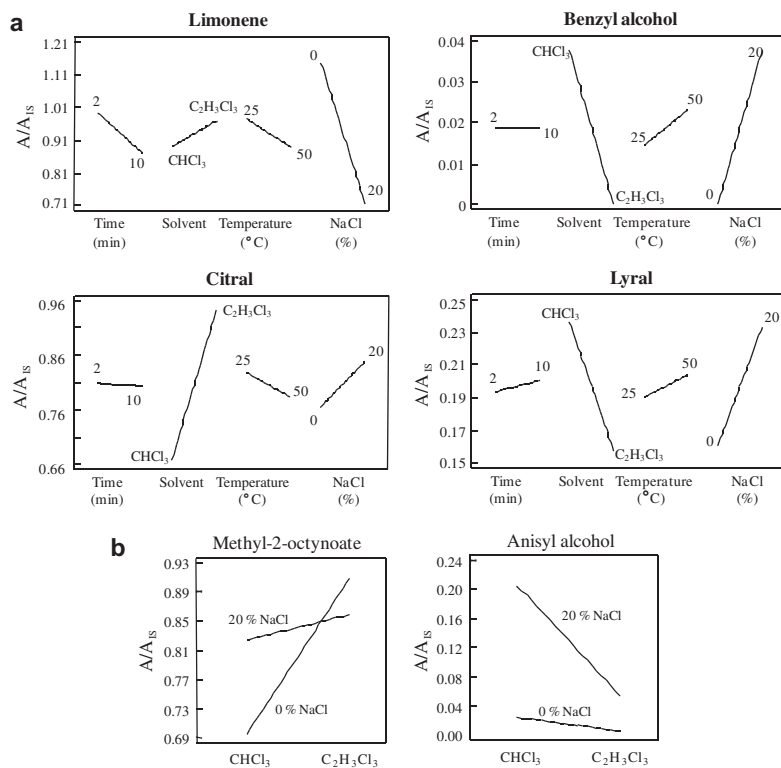


Fig. 3. (a) Main effects and (b) interaction effect (BD, solvent – addition of salt) plots for some selected fragrance allergens.

Table 3
Linearity, limits of detection, recovery and precision of the method.

Compound	Linearity <i>R</i> ²	LOD (ng mL ⁻¹)	Recovery (RSD)%					STP ^c (2 ng mL ⁻¹)
			0.5 ng mL ^{-1a}	2 ng mL ^{-1a}	10 ng mL ^{-1a}	100 ng mL ^{-1b}	BBW ^c (10 ng mL ⁻¹)	
Limonene	0.9986	0.30	25.0 (8.5)	19.0 (6.4)	16.1 (10)	18.2	9.0 (10)	19.9 (3.5)
Benzyl alcohol	0.9995	0.95		21.5 (15)	21.9 (8.3)	19.7	25 (23)	20.9 (4.3)
Linalol	0.9999	0.042	113 (8.1)	89.1 (6.0)	95.4 (2.3)	91.3	87.9 (8.3)	96.3 (1.6)
Methyl-2-octynoate	0.9998	0.055	79.2 (6.8)	81.6 (0.2)	88.7 (4.5)	81.7	81.7 (4.5)	81.8 (10)
Citronellol	0.9997	0.28		91.3 (11)	97.5 (4.3)	86.5	113 (5.3)	94.5 (8.0)
Citral	0.9994	0.064	88.0 (10)	95.6 (6.1)	96.9 (6.5)	85.8	108 (13)	96.4 (3.6)
Geraniol	0.9993	0.45		84.2 (1.9)	95.8 (2.9)	84.7	79.2 (2.9)	91.4 (4.7)
Cinnamaldehyde	0.9999	0.017	99.8 (6.9)	88.7 (5.9)	90.6 (3.7)	81.2	114 (3.1)	88.2 (8.0)
Hydroxycitronellal	0.9999	0.049	88.5 (1.1)	71.8 (2.7)	70.5 (6.9)	63.1	81.4 (3.7)	73.1 (7.0)
Anisyl alcohol	0.9981	1.15		29.4 (3.9)	27.5 (3.9)	26.3	29.1 (14)	22.4 (7.0)
Cinnamyl alcohol	0.9974	0.25		75.8 (8.6)	83.4 (7.5)	70.2	81.5 (6.9)	78.8 (5.8)
Eugenol	0.9998	0.006	105 (6.4)	96.5 (6.6)	96.4 (3.0)	85.1	109 (3.9)	98.6 (5.8)
Methyl eugenol	0.9999	0.0065	105 (8.5)	95.0 (5.1)	96.3 (1.9)	87.8	109 (7.5)	93.3 (3.0)
Isoeugenol	0.9987	0.037	78.0 (8.6)	83.5 (12)	92.6 (5.8)	83.5	82.6 (3.0)	85.5 (9.5)
Coumarin	0.9996	0.011	96.5 (3.6)	86.3 (6.4)	86.6 (4.8)	75.2	98.7 (11)	83.3 (2.1)
Ionone	0.9998	0.012	85.2 (6.7)	77.2 (1.2)	83.3 (7.0)	77.9	90.0 (5.6)	75.4 (0.9)
Lilial	0.9997	0.010	112 (6.7)	89.9 (5.7)	90.2 (7.2)	86.6	88.8 (7.0)	79.5 (1.9)
Amyl cinnamal	0.9999	0.024	102 (7.4)	75.3 (14)	85.7 (3.9)	80.3	72.9 (7.3)	79.1 (4.2)
Lyral	0.9999	0.063	91.8 (8.9)	76.2 (3.1)	75.4 (11)	69.7	89.2 (5.9)	89.9 (0.5)
Amyl cinnamyl alcohol	0.9999	0.28		96.2 (15)	106 (3.4)	84.8	116 (4.8)	108 (6.4)
Farnesol	0.9999	0.55		81.5 (9.0)	81.8 (7.5)	81.7	113 (9.1)	86.7 (7.2)
Hexylcinnam-aldehyde	0.9999	0.026	79.8 (8.8)	72.0 (0.8)	76.6 (3.8)	77.0	70.0 (6.5)	69.7 (11)
Benzyl benzoate	0.9996	0.014	89.0 (10)	86.8 (4.5)	92.5 (6.8)	83.2	96.3 (3.9)	92.4 (4.5)
Benzyl salicylate	1.0000	0.013	95.0 (7.6)	97.5 (1.4)	95.2 (6.3)	85.8	95.3 (4.5)	106 (4.1)
Benzyl cinnamate	0.9993	0.023	70.3 (6.1)	91.0 (2.0)	85.8 (9.2)	78.1	89.4 (5.3)	90.4 (9.2)

^a *n* = 4.

^b *n* = 2.

^c *n* = 3.

Table 4
Target compounds found in different types of water (ng mL⁻¹).

Compound	BBW1	BBW2	BBW3	BBW4	BBW5	BBW6	BBW7	BBW8	BBW9	BBW10	BBW11	BBW12	BBW13	PWP1	PWP2	PWP3	SPW1	SPW2	SPW3	SPW4	ASP	STP
Limonene ^a	0.620	2.64	128	0.380	4.78	1.15	2.22	7.75	4.23	5.95	3.37	7.75	18.9		0.550	0.765					4.98	
Linalol	19.9	76.3	23.0	9.57	87.4	55.2	32.8	4.15	26.1	30.2	204											0.251
Benzyl ^a alcohol	6.55		3.95	2.74	2.83				3385													
Citronellol	91.8	7.59		5.23	1.69	4.29		1.82		51.1					0.987		0.190					
Citral										2.11												
Geraniol	23.4	9.25			4.66		11.5	2.50	2.18	5.67	11.4	21.6	0.444	0.721								
Hydroxy-citronellal																						
Cinnamyl alcohol	1.77			6.02	0.225			0.829	0.706	4.25	6.93			1.02	0.093	0.017	0.180				3.75	
Eugenol															>LOD	>LOD					0.146	
Methyl eugenol			2.48		4.39																	
Ionone																						
Isoeugenol									4.55													
Lilial	0.133	0.462		0.040	0.462		0.385	0.378			0.759	0.417	0.148	0.040	0.052	0.053	0.630	0.133	0.183	0.165	0.995	
Lylal											43.4		0.340									
Coumarin	0.200	23.2	0.500	0.046	11.5	0.990		0.232									0.090		0.101	>LOD		
Hexylcinnam- aldehyde			1.13	0.364	2.13																	
Benzyl benzoate	0.086	2.08	0.364		0.861						8.94	0.247			0.177	>LOD	0.093	0.215	0.077	0.058		
Benzyl salicylate	0.840		0.089	0.894	0.233	0.979	0.300				0.289		2.70									0.092
Benzyl cinnamate																						

Blank spaces mean values below LOD.

^a Values were corrected taking into account the average extraction efficiency.

matrix effects. Samples such as sewage treatment plant (STP) and baby bathwater (BBW), were spiked with the target compounds at different concentrations, and then analyzed by the proposed method. As can be seen in the two last columns of Table 3, recoveries were satisfactory for all compounds, with the exception of the three same compounds with low recovery from milliQ water. These low recoveries were consistent in all samples, and also consistent with the ones obtained from ultrapure water. Therefore, the method can be considered suitable for the determination of 22 of the target compounds in real samples. The concentration of the other three compounds, limonene, benzyl alcohol, and anisyl alcohol, could be estimated introducing a correction factor, although these concentrations should only be considered as estimative values.

Finally, the proposed method was applied to the analysis of several non-spiked water samples, including tap water, baby bathwater, swimming pool and Spa water, public clothes washing place water, and sewage treatment plant water. The presence of some of the target compounds was confirmed in all the samples excluding tap water (see Table 4). In the case of the bathwater samples (BBW), the use of products such as shampoos, bubble baths and moisturising soaps containing fragrances, is the cause of the high levels found for some of the target analytes. The samples from public washing places (PWP), also showed the presence of some allergen fragrances. These samples were taken at evening hours, in the exit collector that directly discharges the wastewater into a river. In this case, the presence of some of the target allergens is due to the use of perfumed clothes cleaning products. Although the number and the concentration of compounds found in winter indoor swimming pool (SPW) and sewage treatment plant (STP) water samples was not very high, the occurrence of fragrance allergens demonstrate the ubiquity of these cosmetic ingredients. A sample collected from an aromatherapy Spa pool (ASP) containing high levels of some of the target allergens is also included.

4. Conclusions

In the present work, a method based on ultrasound-assisted emulsification–microextraction (USAEME) coupled to GC–MS has been developed for the analysis of 25 regulated fragrance allergens in water. USAEME is proposed as an efficient, simple, rapid, environmentally friendly, and non-expensive alternative to other extraction techniques such as solid phase extraction (SPE), SPME and LPME. Using the optimized conditions established after a multivariate study of the USAEME process, good recoveries were obtained for almost all compounds, even in complex samples. Method precision was satisfactory and detection limits at the sub-nanogram per millilitre level were obtained. No matrix effects were observed and, therefore, quantification could be carried out by means of standard calibration. The proposed method was applied to the analysis of several real water samples including tap water, baby bathwater, recreational place water, public washing place water, and sewage water. The presence of fragrance allergens was confirmed in all the samples, demonstrating the ubiquity of the target compounds.

Acknowledgements

This research was supported by FEDER funds and Project CTQ2009-12144 and CTQ2010-19831 (Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain). E.B.-B thanks the Universidad Nacional Autónoma de México, Secretaría General, Dirección General de Asuntos del Personal Académico, for the award of a research scholarship. L.S.-P. and J.P.L. acknowledge Xunta de Galicia for a postdoctoral Angeles Alvario, and Isabel Barreto contracts, respectively.

References

- Bassereau, M., Chaintreau, A., Duperrex, S., Joulain, D., Leijs, H., Loesing, G., Owen, N., Sherlock, A., Schippa, C., Thorel, P.J., Vey, M., 2007. GC–MS quantification of suspected volatile allergens in fragrances. 2. Data treatment strategies and method performances. *J. Agric. Food Chem.* 55, 25–31.
- Bossio, J.P., Harry, J., Kinney, C.A., 2008. Application of ultrasonic assisted extraction of chemically diverse organic compounds from soils and sediments. *Chemosphere* 70, 858–864.
- Capelo, J.L., Mota, A.M., 2005. Ultrasonication for analytical chemistry. *Cur. Anal. Chem.* 1, 193–201.
- Chunhong, J., Xiaodan, Z., Li, C., Min, H., Pingzhong, Y., Ercheng, Z., 2010. Extraction of organophosphorus pesticides in water and juice using ultrasound-assisted emulsification–microextraction. *J. Sep. Sci.* 33, 244–250.
- EU, 2009. Regulation (EC) No. 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on Cosmetic Products (recast). Official Journal of European Union, p. 59.
- Fontana, A.R., Altamirano, J.C., 2010. Sensitive determination of 2,4,6-trichloroanisole in water samples by ultrasound assisted emulsification microextraction prior to gas chromatography–tandem mass spectrometry analysis. *Talanta* 81, 1536–1541.
- Fontana, A.R., Wuilloud, R.G., Martinez, L.D., Altamirano, J.C., 2009. Simple approach based on ultrasound-assisted emulsification–microextraction for determination of polibrominated flame retardants in water samples by gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1216, 147–153.
- IFRA. International Fragrance Association. <<http://www.ifraorg.org/Home/page.aspx/3>> (accessed June 2010).
- Lamas, J.P., Sanchez-Prado, L., Garcia-Jares, C., Llompert, M., 2009. Solid-phase microextraction gas chromatography–mass spectrometry determination of fragrance allergens in baby bathwater. *Anal. Bioanal. Chem.* 394, 1399–1411.
- Lamas, J.P., Sanchez-Prado, L., Garcia-Jares, C., Llompert, M., 2010. Determination of fragrance allergens in indoor air by active sampling followed by ultrasound-assisted solvent extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1217, 1882–1890.
- Leijs, H., Broekhans, J., van Pelt, L., Mussinan, C., 2005. Quantitative analysis of the 26 allergens for cosmetic labeling in fragrance raw materials and perfume oils. *J. Agric. Food Chem.* 53, 5487–5491.
- Ma, J.J., Du, X., Zhang, J.W., Li, J.C., Wang, L.Z., 2009. Ultrasound-assisted emulsification–microextraction combined with flame atomic absorption spectrometry for determination of trace cadmium in water samples. *Talanta* 80, 980–984.
- Niederer, M., Bollhalder, R., Hohl, C., 2006. Determination of fragrance allergens in cosmetics by size-exclusion chromatography followed by gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1132, 109–116.
- Ozcan, S., Tor, A., Aydin, M.E., 2009a. Application of ultrasound-assisted emulsification–micro-extraction for the analysis of organochlorine pesticides in waters. *Water Res.* 43, 4269–4277.
- Ozcan, S., Tor, A., Aydin, M.E., 2009b. Determination of selected polychlorinated biphenyls in water samples by ultrasound-assisted emulsification–microextraction and gas chromatography–mass-selective detection. *Anal. Chim. Acta* 647, 182–188.
- Pumure, I., Renton, J.J., Smart, R.B., 2010. Ultrasonic extraction of arsenic and selenium from rocks associated with mountaintop removal/valley fills coal mining: estimation of bioaccessible concentrations. *Chemosphere* 78, 1295–1300.
- Rastogi, S.C., Johansen, J.D., Menné, T., Frosch, P., Bruze, M., Andersen, K.E., Lepoittevin, J.P., Wakelin, S., White, I.R., 1999. Contents of fragrance allergens in children's cosmetics and cosmetic-toys. *Contact Dermatitis* 41, 84–88.
- Regueiro, J., Llompert, M., Garcia-Jares, C., Garcia-Monteagudo, J.C., Cela, R., 2008. Ultrasound-assisted emulsification–microextraction of emergent contaminants and pesticides in environmental waters. *J. Chromatogr. A* 1190, 27–38.
- Regueiro, J., Llompert, M., Psillakis, E., Garcia-Monteagudo, J.C., Garcia-Jares, C., 2009. Ultrasound-assisted emulsification–microextraction of phenolic preservatives in water. *Talanta* 79, 1387–1397.
- SCCNFP/0017/98, 1999. Final Fragrance Allergy in Consumers Brussels.
- Sgorbini, B., Ruosi, M.R., Cordero, C., Liberto, E., Rubiolo, P., Bicchi, C., 2010. Quantitative determination of some volatile suspected allergens in cosmetic creams spread on skin by direct contact sorptive tape extraction–gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1217, 2599–2605.
- WHO. Guidelines for Safe Recreational Water Environments. vol. 2. Swimming Pools and Similar Environments. World Health Organization. <http://www.who.int/water_sanitation_health/bathing/bathing2/en/>. (accessed June 2010)

Ultrasound-assisted emulsification–microextraction for the analysis of several high production volume chemicals in environmental waters

Carmen Garcia-Jares*, Jose E. Becerril, Lucia Sanchez-Prado, J. Pablo Lamas, Thierry Dagnac, Maria Llompart

^aDepartamento de Quimica Analitica, Nutricion y Bromatologia, Facultad de Quimica.

Campus Sur. Universidad de Santiago de Compostela, E-15782, Santiago de Compostela, Spain

^bInstituto de Ingenieria, Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Ciudad Universitaria, 04510 Mexico, D.F., Mexico.

^cGalician Institute for Food Quality (INGACAL), Agronomic and Agrarian Research Centre (CIAM), Apartado 10, 15080 A Coruña, Spain

Abstract

A method based on *in-situ* derivatization-ultrasound-assisted emulsification–microextraction (USAEME) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) has been developed for the analysis of benzothiazole (BTZ), 4-*tert*-butylphenol (TBP), 2-phenylphenol (PP) and piperonyl butoxide (PBO) in waters. These chemicals are characterized by its high production volume and worldwide spread use as part of the composition of many goods, insecticides, as well as intermediates in chemical processes. The extraction conditions including the *in-situ* acetylation of the phenols, were optimized using an experimental design strategy. In the proposed procedure, compounds were extracted during 5 min in an acoustically emulsified media formed by 200 μL chloroform and 10 mL sample. The derivatization-USAEME process provided an efficient and exhaustive extraction with the advantage that after centrifugation, the extract was ready for GC-MS and GC-MS/MS analysis.

Validation of the method was performed using environmental water samples. Recoveries between 68 and 111% were obtained, and precision was characterized by RSD values $\leq 10\%$. The limits of quantification (LOQs) were at the sub-ng per millilitre level (0.004-0.072 ng mL^{-1}). The procedure was applied to the determination of the target compounds in different waters including influent and effluent waters of sewage treatment plants. The presence of the target compounds was confirmed in the samples.

In addition, we report for the first time that the presence of chlorine as disinfection agent in the water did not affect BTZ and PBO, which remained stable even at 4 mg L^{-1} of chlorine concentration, whereas the phenolic compounds (TBP and PP) required lower chlorination levels to be transformed into several mono- and di-chlorinated derivatives.

Introduction

The increasing concern about residues from industrially important compounds demands the evaluation of their occurrence and fate in the environment. The worldwide annual production of many chemicals with application, among others, in the pesticide industry is estimated at several hundreds or thousands of tons. High production volume chemicals encompasses a wide range of chemicals that can easily enter the aquatic environment and be found as emerging pollutants in waters. The interest of this work has been focused on four compounds from very different chemical families: benzothiazole, 4-*tert*-butylphenol, 2-phenylphenol, and piperonyl butoxide.

Benzothiazole (BTZ) is known to be an intermediate in rubber vulcanisation processes, and serves as a biocorrosion inhibitor [1]; it has also been found to be a stable sunlight photolysis derivative of thiocyanate methylthiobenzothiazole (TMBT), widely used as anti-sap stain in the lumber industry and as fungicide in leather processing [2]. As well as other BTZ-related compounds, it is regularly released with treated municipal wastewater and exhibits a considerable lifetime in surface waters [3].

4-*tert*-Butyl phenol (TBP) has a wide use as UV light stabiliser, rubber chemical, corrosion inhibitor, and in insecticides [4], among others. TBP is considered as an endocrine disruptor [5], irritant to the skin, eyes, and respiratory tract. A carcinogenicity study indicated that this chemical has promoted activity of fore stomach carcinogenesis in rats treated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) [6]. Besides, since the structurally related chemical 2(3)-*tert*-butyl-methoxyphenol is a clear carcinogen, the carcinogenic potential of this chemical should not be ruled out.

2-Phenylphenol (PP) is used as a disinfectant, bactericide and virucide. In agriculture, it is used in disinfecting fruits, vegetables and eggs. PP is also used as a general surface disinfectant in hospitals, nursing homes, veterinary hospitals, poultry farms, dairy farms, commercial laundries, barbershops and food processing plants. It is also used to sterilize hospital and veterinary equipment [7, 8]. PP is a suspected reproductive toxicant, and its genotoxicity has been studied [9].

Piperonyl butoxide (PBO) is an insecticide synergist. It acts by protecting the co-applied insecticide (e.g. pyrethrins, pyrethroids and other pesticides) from metabolic attack thus allowing it to reach their biochemical targets. Since PBO inhibits an enzyme system which is catalysing oxidative processes in living systems, it also has an intrinsic toxic potential to arthropods. It is present in roughly 1500 registered products, in combination with pyrethrins, pyrethroids and other pesticides used in public health, household and human and veterinary medicinal products, agriculture, stored product protection, home and garden, etc [10]. PBO has been studied for immuno- and allergotoxicological properties [11], and the EPA classifies it as a group C carcinogen, a possible human carcinogen [12].

Analytical methods developed for these chemicals are generally scarce. Some of these compounds have been included in waters studies usually associated to the analysis of pesticides (PBO and PP) or to the analysis of corrosion problems (BTZ). Most methods are based on liquid-liquid extraction techniques [13] and solid-phase extraction (SPE) [14] using large volumes of sample. The use of solid-phase microextraction has also been reported [15].

To allow investigating the occurrence of these pollutants in waters, a simple methodology based on liquid-liquid microextraction assisted by ultrasounds is proposed for the first time. The ultrasound-assisted emulsification–microextraction (USAEME) technique has been proposed by Regueiro et al [16], and is based on the emulsification of a microvolume of organic extractant in an aqueous sample by ultrasound radiation and further separation of both liquid phases by centrifugation. The application of ultrasonic radiation accelerates the mass-transfer process between two immiscible phases, which together with the large surface of contact between both phases leads to an increment in the extraction efficiency in a minimum time. After its introduction in 2008, USAEME has found successful application worldwide [17-21].

The proposed procedure includes *in-situ* acetylation of the phenolic compounds (TBP and PP). The optimization of the derivatization-extraction conditions is conducted using experimental design tools.

Several environmental water samples including river water as well as samples taken from different sewage treatment plants, have been analyzed, showing the presence of the compounds in the samples. In addition, since chlorination is very common as water disinfection method, experiments have been performed to establish the behaviour of the studied compounds in front of chlorination. To the best of our knowledge, this is the first time that the formation of chlorinated derivatives of TBP and PP is reported.

Materials and methods

Reagents and materials

Benzothiazole (BTZ) 96% was purchased from Aldrich (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany); 4-*tert*-butylphenol (TBP) was purchased from Fluka (Fluka Chemie GmbH, Steinheim, Germany). 2-Hydroxybiphenyl (2-phenylphenol, PP) and 5-[2-(2-butoxyethoxy)ethoxymethyl]-6-propyl-1,3-benzodioxole (piperonyl butoxide, PBO) were obtained from Riedel-de-Haen (Seelze, Germany). The internal standard PCB-30 (2,4,6-Trichlorobiphenyl) was purchased from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). Ethyl acetate, acetone, chloroform (CLF), 1,1,1-trichloroethane (TCE), acetic anhydride, pyridine, sodium hypochlorite solution (reagent grade, available chlorine $\geq 4\%$) and sodium chloride were provided by Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany). All solvents and reagents were analytical grade. Sodium hydrogen phosphate

heptahydrate and sodium thiosulphate were purchased from Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany).

Individual stock solutions of each compound were prepared in acetone and a standard mixture solution was prepared in acetone at a final concentration of about $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Different standard working solutions were obtained by appropriate dilution and stored in amber colored vials at $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Water samples were filtrated through a $0.45 \mu\text{m}$ Millipore HA membrane filter (Billerica, MA, USA).

Ultrasound-assisted emulsification–microextraction (USAEME) with in-situ derivatization

For the simultaneous derivatization and USAEME, aliquots of 10 mL water samples were placed in 15 mL conical-bottom glass centrifuge tubes, where 0.1 g sodium hydrogen phosphate were previously weighted. Under final optimized conditions, 200 μL of chloroform (extracting solvent), 10 μL of a $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ of PCB-30 in acetone (internal standard), and 200 μL of acetic anhydride (derivatization agent) were added. The tube was then immersed into a 5 L-ultrasonic water bath (Selecta, Barcelona, Spain) in such a way that the level of both liquids (bath and sample) was the same. Extractions were performed at 40 kHz of ultrasound frequency and 110 W of power for 5 min. As a result, oil-in-water (O/W) emulsions of chloroform (dispersed phase) in water (continuous phase) were formed. Emulsions were then disrupted by centrifugation at 3700 rpm for 10 min and the organic phase was sedimented at the bottom of the conical tube. Chloroform was removed by using a 100 μL Hamilton syringe (Reno, NV, USA) and transferred to a 100 μL glass insert located in a 1.8 mL gas chromatography vial. The thus obtained extracts were stored at $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ until chromatographic analysis.

Quantization was carried out using derivatized standard solutions in chloroform of the analytes. In this case, acetylation was carried out by adding 100 μL of acetic anhydride containing 2.5 % of pyridine to 1 mL of the standard [22]. The mixture was then maintained at $80 \text{ }^\circ\text{C}$ for 10 min, and then allowed to cool down to room temperature.

Chlorination

Experiments of chlorination were performed using chlorine water solutions prepared by proper dilution of the analytical reagent (sodium hypochlorite). These solutions were spiked with the standard mixture of analytes to obtain a 10 ng mL^{-1} concentration. After the selected reaction time, the excess of free chlorine was removed with sodium thiosulphate (0.1 mg mL^{-1}), and USAEME was carried out as described before. In these experiments, the derivatizing agents were not added to avoid for possible side-reactions.

Gas chromatography–mass spectrometry

The GC-MS/MS analysis was performed using a Polaris Q ion trap mass detector (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) coupled to a Trace GC Ultra gas chromatograph equipped with an AS 3000 autosampler and a

PTV injector. This injector was equipped with a 12 cm×2mm i.d. Silcoseeve liner (ThermoFinnigan). Two μL of sample were injected onto the PTV injector in the constant flow mode set at 1 mL min^{-1} . The temperature of the injector was initially set at 40°C , then increased to 220°C at a rate of 14.5°C/s where it was maintained for 9 min. The PTV split/splitless valve was operated in the splitless mode until the temperature of 220°C was achieved. Once the temperature stabilised, it was maintained for 1.3 min, then changed to the split mode. Compounds were separated on a $30\text{m}\times 0.25\text{mm}$ i.d. column, coated with $0.25 \mu\text{m}$ of 95% dimethyl–5% phenyl polysiloxane phase (Thermo TR-5ms, San Jose, CA, USA). The temperature of the column was initially set at 80°C for 1 min, and then increased at a rate of 10°C/min to its final temperature of 280°C , which was maintained for 5 min. Helium was used as the carrier gas at a constant flow of 1 mL min^{-1} . The transfer line was set at 280°C with the external ion source at 230°C . Electron impact ionization (EI) positive mode ($+70\text{eV}$) was used in the mass spectrometer and the damping gas flow in the ion trap was set to 0.9 ml min^{-1} . The precursor ions were selected among the most intense characteristic ions of the MS spectrum, giving rise to the most efficient MS/MS transitions in the ion trap. Whenever possible, two or three product ions were monitored in the full MS/MS spectra for unambiguous identification of the analytes.

Specific MS/MS conditions and retention times for each target compound are listed in Table 1.

Table 1. Some physico-chemical characteristics, and GC-MS/MS method conditions for the target compounds

Compound	CAS number	pK_{ow}	Boil. point ($^\circ\text{C}$)	Ret. Time (min)	Parent Ion (m/z)	Collision energy (V)	q	Ident./Quant. Ions (m/z)
Benzothiazole (BTZ)	95-16-9	2.01	193	6.92	135.1	1.3	0.225	84.1 + 91.1 + 108.1 + 135.1
4- <i>tert</i> -Butylphenol (TBP)	98-54-4	3.29	234	8.93	135.1	1	0.225	95.2 + 107.1 + 135.1
2-Phenylphenol (PP)	90-43-7	3.30	282	11.73	170.1	1.2	0.225	142.2 + 170.1
Piperonyl butoxide (PBO)	51-03-6	4.80	180	19.31	176.1	1.1	0.225	118.1 + 146.1 + 161.1 + 176.1
PCB-30 (IS)	35693-92-6	5.47	341	13.33	186.1	1.4	0.3	151.2 + 186.1

An Agilent 7890A gas chromatograph provided with a 5975C inert MSD with triple axis detector and a 7693 autosampler from Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA), was also employed for several extraction and chlorination experiments. The temperatures of the transfer line, the quadrupole and the ion source were set at 290, 150 and 230°C , respectively. The system was

operated by Agilent MSD ChemStation E.02.00.493 software. Separation was carried out on a HP5 capillary column (30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness) from Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA). Helium (purity 99.999%) was employed as carrier gas at a constant column flow of 1.0 mL min⁻¹. The GC oven temperature was programmed from 80 °C (held 2 min) to 280 °C at 10 °C min⁻¹ (held 3 min) (total analysis time = 25 min). After 1 min the split was opened at a flow of 75 mL min⁻¹ and the injector temperature was kept at 220 °C. The injection volume was 1 μL. The mass spectra detector (MSD) was operated in the scan mode and the mass range was varied from 40 to 500 m/z, starting at 4 min and ending at 25 min. The electron multiplier was set at a nominal value of 1200 V.

Results and discussion

Optimization of the experimental procedure

Parameters potentially influencing the efficiency of the analytical procedure have been studied using a screening design. The type of extraction solvent, the addition of derivatizing agents, the ultrasounds application time, and the salting-out effect, have been selected.

The selection of an appropriate extractant is an important parameter for USAEME processes. Based on previous studies [16, 23], both chloroform and 1,1,1-trichloroethane were tested in the experimental design in an attempt to achieve the highest extraction efficiency for the target compounds.

The target compounds could be GC analyzed without further treatment of the extracts since all of them exhibited chromatographic responses and retention times below 20 min at the experimental conditions. However, a derivatization step is highly recommended for the GC analysis of polar nature compounds such as phenols, being acetylation with acetic anhydride one of the most simple and cheap derivatization procedures for phenolic compounds in aqueous media [24-26]. In this way, the improved acetylation procedure proposed by Regueiro et al. [17] has been tested. Results obtained confirmed the acetylation of the phenolic targets (TBP and PP), with retention times shifted to higher values than those of the corresponding underivatized compounds, and much more symmetrical chromatographic peak shapes. Mass spectra of the acetylated derivatives resembled spectra of the corresponding underivatized compounds since molecular ions were not present, and only small differences in the intensity of the most abundant ions were observed. The absence of molecular ions in mass spectra of phenols acetylated derivatives as a result of the loss of the acetyl group upon ionization has been previously reported [22, 27]. Even considering the chromatographic advantages of phenols acetylation, the addition of the derivatizing reagents to the samples modifies the sample medium and might affect the extraction of the non-phenolic compounds. For this reason, the addition of derivatizing reagents has been included as a factor in the experimental design. The effect of extraction time was examined at two levels, 5 and 10 min. The last factor

considered was the salting-out effect. Sodium chloride addition was evaluated at three concentration levels in the aqueous solution, 0% (no addition), 15% (w/v) and 30% (w/v).

The selected optimization strategy consisted on a mixed levels fraction screening design consisting of a fraction $3 \times 2^{3-1}$ design, involving a total of 12 experiments. Factor levels and the corresponding identification keys are summarized in Table 2. The selected design allows to determine which factors have a statistically significant effect, as well as which are the significant interactions between factors. Experiments have been performed using 10-mL aliquots of milliQ water spiked with the analytes at a concentration of 5 ng mL⁻¹.

Table 2. Factors and levels selected for the experimental design optimization

Factor	Key	Factor level		
		Low	Intermediate	High
NaCl (%)	A	0	15	30
Time (min)	B	5		10
Solvent type	C	Chloroform (CLF)		Trichloroethane (TCE)
Derivatizing reagents	D	No		Yes

Numerical analysis of data resulting from the experimental design was made using the Statgraphics XV Centurion statistical software package (Manugistics, Rockville, MD, USA). ANOVA results are shown in Table 3. For the sake of simplicity, only the interactions between factors that were significant in any case have been included. ANOVA information can be clearly shown in the Pareto charts (Figure 1a).

Table 3. *F* ratios and *p* values obtained from the ANOVA

	Main effects								Interactions									
	A		B		C		D		AD		BC		AA		CD			
	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>		
BTZ	69.49	+	2.29		13.16	+	0.12				26.99	+					12.25	+
TBP	11.41	+	0.03		8.92		75.26	+	99.03	+	15.60	+						
PP	39.83	+	0.03		0.18		234.63	+	44.43	+								
PBO	1.99		2.49		1.91		68.03	+					51.00	+				

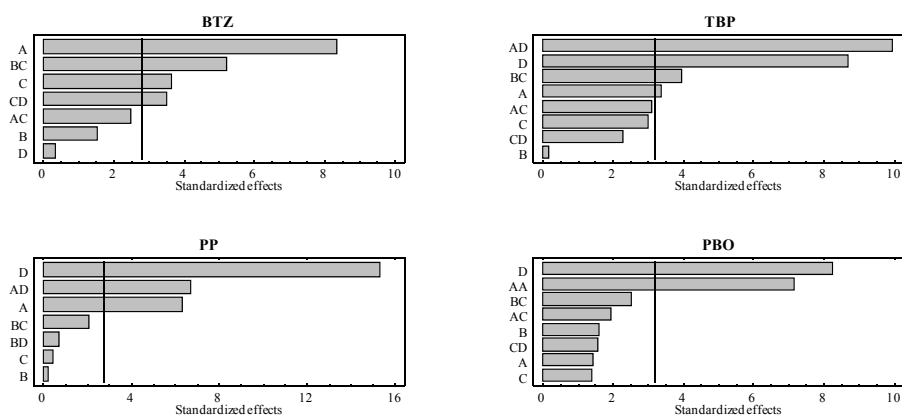
+ cell, *P* value < 0.05; empty cell, *P* value > 0.05.

In these graphics the length of each bar is proportional to the absolute value of its associated standardized effect. Vertical line in the graphs represents the statistically significant bound at the 95% confidence level.

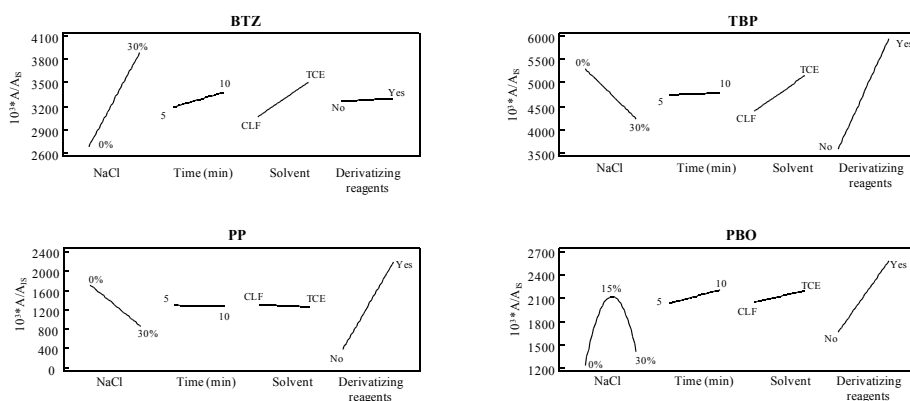
Main effects plots are displayed in Figure 1b. This kind of plots shows the main effects with a line drawn between the low and the high level of the corresponding factors. The length of the lines is proportional to the effect magnitude of each factor in the extraction process, and the sign of the slope indicates the level of the factor that produces the highest response.

Figure 1. (a) Pareto charts showing the significant factors (95%) for the target analytes (see factor codes in Table 2). **(b)** Main effects plots (CLF: chloroform; TCE: trichloroethane).

a



b



The concentration of sodium chloride and the addition of derivatizing reagents were the most important factors and its influence is clearly appreciated

(Figure 1b). For two of the studied compounds (TBP and PP), higher efficiency was observed when there is no addition of sodium chloride, while for BTZ better responses are obtained when 30% of sodium chloride is added. The addition of acetylating agents showed a significant higher extraction efficiency for TBP, PP and PBO. Although PBO is not acetylated, it seems that the presence of the derivatizing reagents increases the tendency of PBO to dissolve into the extracting phase. Regarding the extraction solvent, this factor was significant for BTZ, and in this case, 1,1,1-trichloroethane gave responses of only about 10% higher than those obtained using chloroform. Since the significantly lower price of chloroform, this last solvent was finally selected. The extraction time was not significant in any case.

The interaction between the two most important main factors, salt and derivatizing reagents addition (AD), was significant for TBP and PP, even being the most important factor for the extraction of TBP (see Figure 1a). The presence of NaCl has an adverse effect on the extraction of the compounds from the aqueous solution containing the acetylating reagents.

In view of the results of the experimental design, the selected general conditions for the simultaneous *in-situ* derivatization-USAEME of the target compounds from water samples were as follows: addition of the acetylation reagents to the sample, and extraction with chloroform employing a sonication time of 5 min.

Method performance. Application to real samples

The performance of the proposed method was evaluated in terms of accuracy, precision, linearity, and limits of quantification. In order to assess its feasibility, experiments were carried out using real water samples.

Table 4. Performance parameters of the proposed method

Compound	Linearity (R)	LOQ (ng mL ⁻¹)	Recovery ± RSD (% , n=3)		
			Effluent	Influent	Spring
BTZ	0.9999	0.072	88.7±4.7	96.1 ± 7.1	76.5 ± 6.1
TBP	1.0000	0.004	96.7±0.5	69.7 ± 7.7	86.4 ± 4.9
PP	0.9999	0.004	92.2±5.2	72.8 ± 8.0	68.3 ± 5.1
PBO	0.9999	0.020	111±8	106 ± 3	70.9 ± 9.9

Accuracy of the method was evaluated using samples of a spring water, an effluent wastewater, and an influent wastewater spiked at concentrations of 1, 0.5 and 2 ng mL⁻¹, respectively. Recoveries were calculated by dividing the difference between the measured concentrations for spiked and non spiked

samples by the added concentrations. As can be seen in Table 4, recoveries were satisfactory for all compounds, with values ranging from 68.3 to 111%. The precision of the method was evaluated by calculating the relative standard deviation (RSD) at the same concentration levels. Results are also shown in Table 4, and they were lower than 10% in all cases.

Linearity was tested using acetylated standards prepared in chloroform at concentrations ranging between 2 and 1000 ng mL⁻¹. Correlation coefficients (R) between 0.9999 and 1.0000 were obtained for all compounds (Table 4). Instrumental detection limits (IDL) were estimated for a signal-to-noise ratio of 3 (S/N=3), and values ranged from 0.001 to 0.006 ng mL⁻¹. Since the presence of BTZ was observed in some of the procedural blanks, the LOQ for this compound was estimated as that corresponding to the average amount of analyte giving a response that is the blank signal plus 10 times the standard deviation (LOQ = blank signal + 10SD). The source of BTZ in blanks might be due to their presence at low levels in the ultrapure water or to contamination through the analytical process. As shown in Table 4, LOQ values ranged from 0.004 ng mL⁻¹ to 0.072 ng mL⁻¹.

Finally, the proposed method was applied to the analysis of several non-spiked water samples, including river water, and the effluent and influent waters from different STPs. The presence of the targets was confirmed in the samples. BTZ was found above the quantification limit in all the samples, at concentrations in a range of 0.10-0.37 ng mL⁻¹ (see Table 5). TBP and PP were found in some of the effluents, whereas PBO was found in three of the seven samples at concentrations over the LOQ.

Table 5. Target compounds found in river and wastewaters samples (ng mL⁻¹)

Comp.	River1	River2	Ef. STP1	Ef. STP2	Ef. STP4	Inf. STP3	Inf. STP4
BTZ	0.137	0.222	0.204	0.370	0.164	0.123	0.101
TBP	-	-	-	0.113	-	-	-
PP	-	-	0.0886	0.123	-	-	-
PBO	-	-	0.024	-	-	0.025	0.031

Chlorination experiments

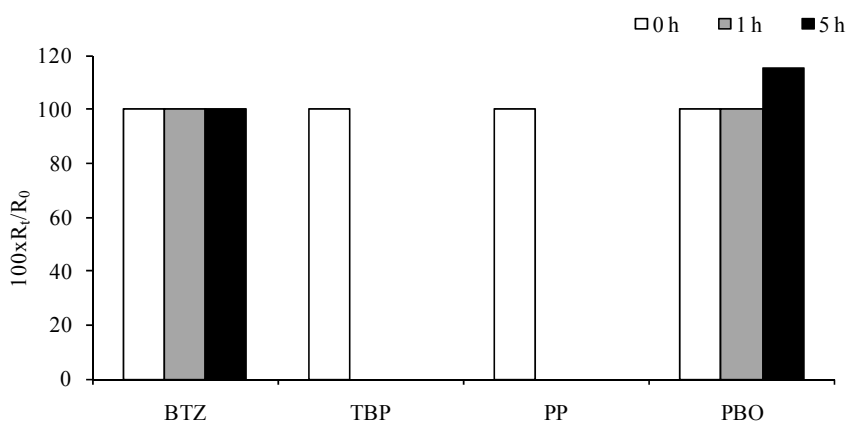
The target compounds have been found in waters that may be treated for drinking and other uses such as recreational. Chlorination is a widespread procedure of water disinfection that can decompose and thus be useful to remove the target chemicals, but it also may generate undesirable chlorination by-products.

Sodium hypochlorite exists in aquatic solution mainly as hypochlorous acid and hypochlorite anion, which can react with organic compounds by addition, substitution or oxidation. In disinfection processes, many factors would have influence on chlorination disinfection by-products formation and distribution, e.g. chlorine dosage and chlorination time.

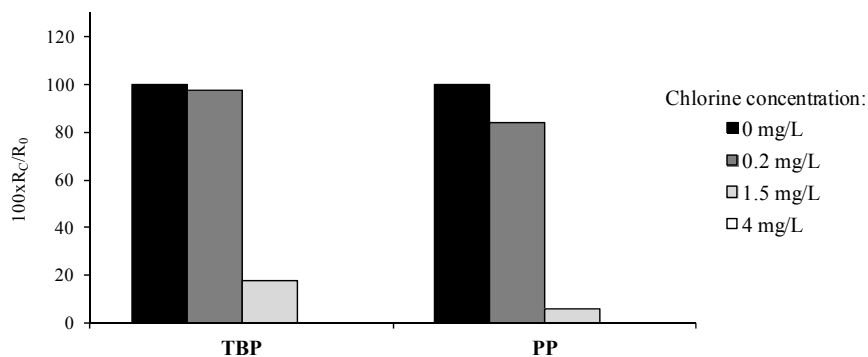
Some experiments were carried out in order to check if the studied compounds were degraded in the presence of chlorine. In this case, sodium hypochlorite was added to MilliQ water (pH= 5.6) to reach a final concentration of 4 mg L⁻¹ expressed as chlorine, which is the maximum residual disinfectant level (MRDL) regulated by EPA [28], and about 10 times over the usually recommended minimum breakpoint chlorine concentration [29]. The resulting mixture was extracted and analyzed after 1 hour and 5 hours of reaction. These experiments were performed without adding derivatization reagents to avoid for possible interferences. Complete degradation of TBP and PP was observed after 1 hour of reaction, whilst the responses of BTZ and PBO were not affected (Figure 2a).

Figure 2. (a) Relative responses obtained after 1 and 5 hours of reaction with chlorine (4 mg L⁻¹) (R_t : Response at time t; R_0 : response at time 0) **(b)** Effect of the chlorine concentration on the degradation of TBP and PP (R_c : Response at concentration C; R_0 : response at concentration 0).

a



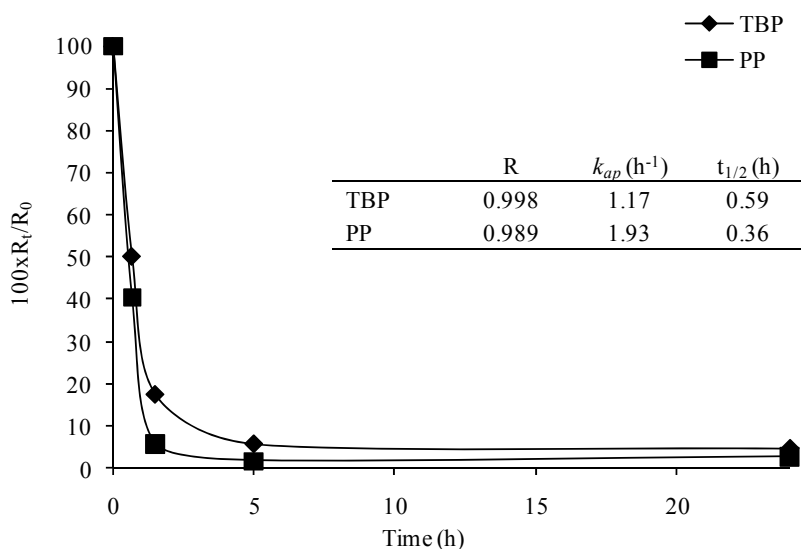
b



The influence of the initial concentration of chlorine on the degradation of TBP and PP was evaluated at 1.5 h of reaction. As can be seen in Figure 2b, the concentration of TBP and PP decreased with increasing concentrations of chlorine. The exposition to low concentrations of chlorine (0.2 mgL^{-1}) did only decrease the TBP and PP concentrations in 3 and 13%, respectively, whereas the residual concentrations of both compounds at 1.5 mgL^{-1} chlorine level in water were 16 and 5%, respectively.

The kinetics of the degradation of TBP and PP in the presence of 1.5 mgL^{-1} chlorine were followed and the results are depicted in Figure 3. As can be seen, in less than one hour of reaction (c.a. 45 min) the concentrations of both compounds were reduced to half, and the degradation of both compounds was complete ($>94\%$) after 5 h reaction.

Figure 3. Kinetics of the degradation of TBP and PP (chlorine concentration: 1.5 mg L^{-1}), showing the experimentally calculated kinetic parameters.



The degradation of PP was slightly faster than the one of TBP. These reactions followed pseudo-first order kinetics and the first-order rate constants (k_{ap}) can be determined as the slopes of the straight-line equations obtained from linear regression: $\ln C$ vs. time plot. The corresponding half-lives are calculated using the following expression: $t_{1/2} = \ln 2/k_{ap}$. These data are also showed in Figure 3.

The degradation reactions of TBP and PP in the presence of chlorine led to the formation of several by-products, five of which were detected in these experiments, as can be seen in the chromatogram of a chlorinated water sample (1.5 mgL^{-1}) depicted in Figure 4. These by-products were tentatively identified on the basis of their mass spectra and the results are shown in Figure 4. Two compounds are formed by chlorination of TBP (monochloro-TBP and dichloro-TBP), and the other three are generated when PP combined

with one and two chlorine atoms (two isomers have been detected for the monochlorinated derivative). Although the formation of chlorination disinfection by-products of phenolic compounds [30, 31], and endocrine disruptors [32, 33] has been previously reported, to the best of our knowledge this is the first time that the formation of chlorinated by-products of TBP and PP is described.

Figure 5 shows the formation and degradation kinetics of TBP and PP detected by-products. It can be appreciated that monochloro-TBP reaches its maximum at 40 min (Figure 5a), when the degradation of the parent TBP reaches the 50% (see Figure 3). At this reaction time, the formation of the dichloro-TBP is 20% and rapidly grows to its maximum at 1.5 h. For both compounds, kinetics curves are very similar showing that at 5 h the residual concentrations of both derivatives are in the range of 20-35% and remain stable in the frame of the experiments (24 h). Figure 5b shows the kinetic behaviour of PP by-products. In this case, monochloro-derivatives are rapidly formed, reaching their 100% at 40 min. After this time, the first monochlorinated by-product transforms into dichloro-PP, which quickly reaches its maximum at 1.5 h. Degradation-formation curves of monochloro-PP2 and dichloro-PP are similar from 1.5 h to the end of the kinetics experiment (24h), showing that both derivatives are very stable, with remaining water concentrations of 60-80%.

Figure 4. Ion chromatograms of the chlorination obtained TBP and PP by-products (chlorine concentration: 1.5 mg L⁻¹), showing the experimental and NIST mass spectra of the by-products.

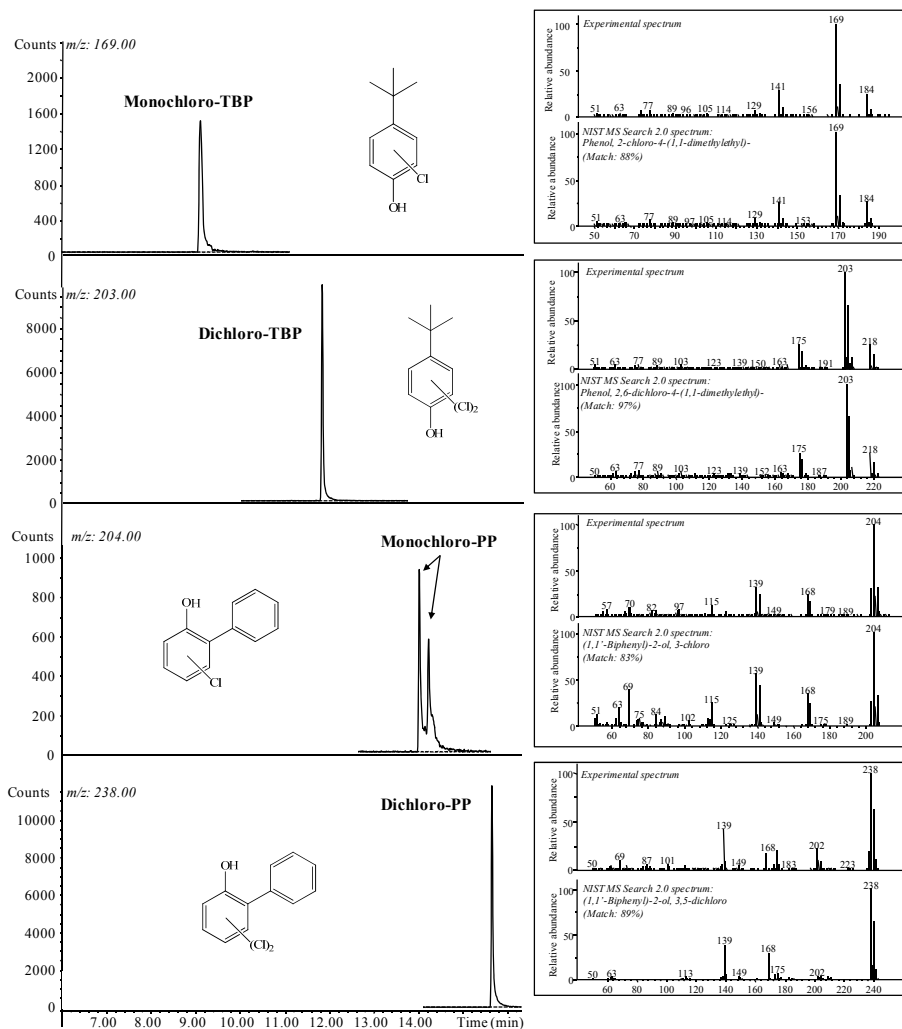
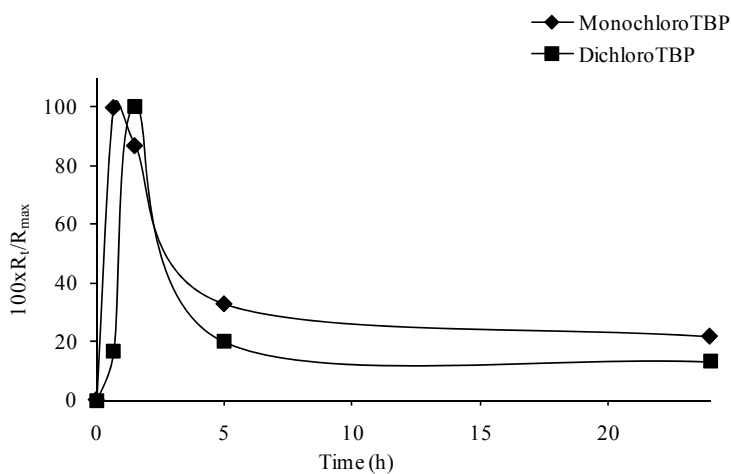
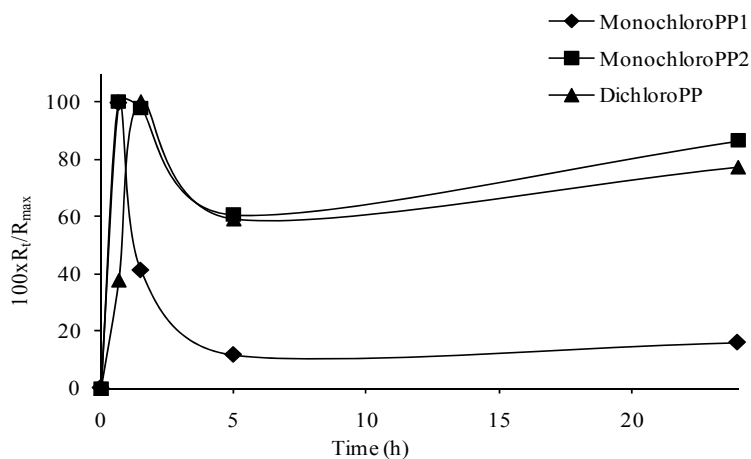


Figure 5. (a) Formation and degradation kinetics of TBP by-products. **(b)** Formation and degradation kinetics of PP by-products

a



b



Conclusions

In the present work, a method based on ultrasound-assisted emulsification–microextraction (USAEME) has been developed for the analysis in water of four high production volume chemicals (benzothiazole, 4-tert-butylphenol, 2-phenylphenol and piperonyl butoxide). USAEME is proposed as an efficient and non-expensive extraction technique. Under the optimized conditions

established after a multivariate study of the USAEME process, good recoveries were obtained for all compounds, even in complex water samples (sewage water). Method precision was satisfactory and quantification limits at the sub-nanogram per millilitre level were obtained. The proposed method was applied to the analysis of several real water samples including rivers and STP influent and effluent waters. Since no matrix effects were observed, quantification could be carried out by means of external calibration using standards in chloroform, allowing high throughput of the analysis and procedural simplicity. The presence of the studied compounds was confirmed in the water samples. In addition, we found that in chlorinated waters the phenolic compounds (TBP and PP) were transformed into mono- and dichlorinated derivatives, some of them quite persistent, while BZT and PBO remained unchanged during at least 24 h, even at chlorine concentrations of 4 mgL⁻¹.

Acknowledgements

This research was supported by FEDER funds and project CTQ2010-19831 (Ministerio de Ciencia e Innovacion, Spain). L. S.-P. and J.P.L. acknowledge Xunta de Galicia for a postdoctoral Angeles Alvariño, and Isabel Barreto contracts, respectively. E. B.-B thanks the Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Secretaría General, Dirección General de Asuntos del Personal Academico, for the award of a research scholarship.

References

- [1] T. Reemtsma, O. Fiehn, G. Kalnowski, M. Jekel, *Environ. Sci. Technol.*, 29 (1995) 478.
- [2] B.G. Brownlee, J.H. Carey, G.A. MacInnis, I.T. Pellizzari, *Environ. Toxicol. Chem.*, 11 (1992) 1153.
- [3] A. Kloepfer, M. Jekel, T. Reemtsma, *Environ. Sci. Technol.*, 39 (2005) 3792.
- [4] L. Badoil, D. Benanou, *Anal. Bioanal. Chem.*, 393 (2009) 1043.
- [5] T.E. Haavisto, N.A. Adamsson, S.A. Myllymäki, J. Toppari, J. Paranko, *Reproductive Toxicology*, 17 (2003) 593.
- [6] UNEP, PHENOL, 4-(1,1,3,3-TETRAMETHYLBUTYL)-, OECD SIDS, UNEP Publications (2000) 1.
- [7] CARB, Toxic Air Contaminant Fact Sheet — 2-Phenylphenol. Sacramento, CA, California Air Resources Board. (1997).
- [8] WHO, 2-Phenylphenol in Drinking-water Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality (2003).
- [9] D. Brusick, *Environ. Mol. Mutagen.*, 45 (2005) 460.
- [10] D.P.J. Jewess, *Integrated Pest Management Reviews*, 5 (2000) 323.
- [11] F. Diel, B. Horr, H. Borck, H. Savtchenko, T. Mitsche, E. Diel, *Toxicol. Lett.*, 107 (1999) 65.

- [12] H. Tovalin-Ahumada, L. Whitehead, *Science of the Total Environment*, 376 (2007) 60.
- [13] M.J. Gomez, M.M. Gomez-Ramos, A. Aguera, M. Mezcua, S. Herrera, A.R. Fernandez-Alba, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 4071.
- [14] R. Rodil, J.B. Quintana, E. Concha-Grana, P. Lopez-Mahia, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodriguez, *Chemosphere*, 86 (2011) 1040.
- [15] V. Casas, M. Llompart, C. Garcia-Jares, R. Cela, T. Dagnac, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387 (2007) 1841.
- [16] J. Regueiro, M. Llompart, C. Garcia-Jares, J.C. Garcia-Monteagudo, R. Cela, *J. Chromatogr. A*, 1190 (2008) 27.
- [17] J. Regueiro, M. Llompart, E. Psillakis, J.C. Garcia-Monteagudo, C. Garcia-Jares, *Talanta*, 79 (2009) 1387.
- [18] A.R. Fontana, R.G. Wuilloud, L.D. Martínez, J.C. Altamirano, *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 147.
- [19] S. Ozcan, A. Tor, M.E. Aydin, *Wat. Res.*, 43 (2009) 4269.
- [20] J. Chunhong, Z. Xiaodan, C. Li, H. Min, Y. Pingzhong, Z. Ercheng, *J. Sep. Sci.*, 33 (2010) 244.
- [21] N. Cabaleiro, F. Pena-Pereira, I.C.I. de, C. Bendicho, I. Lavilla, *Microchem. J.*, 99 (2011) 246.
- [22] L. Sanchez-Prado, J.P. Lamas, M. Lores, C. Garcia-Jares, M. Llompart, *Anal. Chem.*, 82 (2010) 9384.
- [23] E. Becerril-Bravo, J. Pablo Lamas, L. Sanchez-Prado, M. Lores, C. Garcia-Jares, B. Jimenez, M. Llompart, *Chemosphere*, 81 (2010) 1378.
- [24] I. Rodríguez, M.P. Llompart, R. Cela, *J. Chromatogr. A*, 885 (2000) 291.
- [25] M. Llompart, M. Lourido, P. Landín, C. Garcia-Jares, R. Cela, *J. Chromatogr. A*, 963 (2002) 137.
- [26] M. Polo, M. Llompart, C. Garcia-Jares, G. Gomez-Noya, M.-H. Bollain, R. Cela, *J. Chromatogr. A*, 1124 (2006) 11.
- [27] T.R. Croley, B.C. Lynn, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 12 (1998) 171.
- [28] H.-J. Su, C.-J. Chao, H.-Y. Chang, P.-C. Wu, *Atmospheric Environment*, 41 (2007) 1230.
- [29] P. Mocho, V. Larroque, V. Desauziers, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388 (2007) 147.
- [30] F. Ge, L. Zhu, J. Wang, *Desalination*, 225 (2008) 156.
- [31] H. Gallard, A. Leclercq, J.-P. Croué, *Chemosphere*, 56 (2004) 465.
- [32] M. Deborde, S. Rabouan, H. Gallard, B. Legube, *Environ. Sci. Technol.*, 38 (2004) 5577.
- [33] J. Hu, S. Cheng, T. Aizawa, Y. Terao, S. Kunikane, *Environ. Sci. Technol.*, 37 (2003) 5665.