



**UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA**  
FACULTAD DE QUÍMICA  
Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN Y ANÁLISIS ALIMENTARIO

**DESARROLLO DE NUEVAS ESTRATEGIAS DE  
PREPARACIÓN DE MUESTRA APLICADAS AL CONTROL  
DE CONTAMINANTES MEDIOAMBIENTALES A NIVELES  
TRAZA**

**MARÍA DEL ROSARIO RODIL RODRÍGUEZ**

Memoria para optar al grado de Doctora en Química  
Santiago de Compostela, Marzo de 2005



**Dña. Pilar Bermejo Barrera**, Catedrática de Universidad y Directora del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela,

**Informa:**

Que Dña. **María del Rosario Rodil Rodríguez** ha realizado en este departamento, bajo la dirección de Dña. Antonia M<sup>a</sup> Carro Díaz y Dña. Rosa Antonia Lorenzo Ferreira, Profesoras Titulares de Universidad, el trabajo *“Desarrollo de nuevas estrategias de preparación de muestra aplicadas al control de contaminantes medioambientales a niveles traza”*, que presenta para optar al grado de Doctora en Química.

Y para que así conste, firmo el presente informe en Santiago de Compostela, Marzo de 2005.

Dña. Pilar Bermejo Barrera



**Dña. Antonia M<sup>a</sup> Carro Díaz y Dña. Rosa Antonia Lorenzo Ferreira,**  
Profesoras Titulares de Universidad del Departamento de Química  
Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de  
Compostela,

**Autorizan:**

A la licenciada **Dña. Maria del Rosario Rodil Rodríguez,** a la  
presentación de la memoria adjunta, titulada *“Desarrollo de nuevas  
estrategias de preparación de muestra aplicadas al control de  
contaminantes medioambientales a niveles traza”*, que ha realizado bajo  
su dirección en el Departamento de Química Analítica, Nutrición y  
Bromatología de la Facultad de Química, para optar al grado de Doctora  
en Química.

Y para que conste, firmamos la presente en Santiago de  
Compostela, Marzo de 2005.

Dña. Antonia M<sup>a</sup> Carro Díaz

Dña. Rosa Antonia Lorenzo Ferreira



## AGRADECIMIENTOS

Tengo que agradecer a mucha gente su ayuda y apoyo durante estos años tanto a nivel personal como en el desarrollo de este trabajo, la verdad es que me resulta muy difícil y me invade la tristeza al escribir esta hoja porque es como una despedida. Por si alguien se me olvida, gracias a todos.

Quiere expresar mi agradecimiento al Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología y al Instituto de Investigación y Análisis Alimentario, en especial a Rafael Cela y a todo su grupo por facilitarme los medios necesarios y permitirme realizar este trabajo.

Al Ministerio de Ciencia y Tecnología (Proyectos BQU2002-01944, REN2000-0984 HID y BQU2003-02090) y a la Xunta de Galicia (Proyecto PGIDT01PX23701PN) por el financiamiento de este trabajo. Además quiero agradecer a la Xunta de Galicia por la concesión de la beca de tercer ciclo y la beca predoctoral y a la Universidad de Santiago de Compostela y a la Xunta de Galicia por las ayudas para estancias en el extranjero.

A mis jefas, Toñi y Tuchi por su orientación, apoyo y comprensión, por todo lo que me han enseñado, y por su confianza en estos 5 años.

A Isaac, porque siempre se puede contar contigo, por tu ayuda en mi lucha con los equipos y por tus consejos, he aprendido mucho de ti.

Thanks to Prof. Carlo Creszenci and Prof. Thorsten Reemtsma for their welcome and help during my stages in Stockholm University and Technical University of Berlin, respectively.

A todos mis compañeros del IIAA, los que ya se han ido y los que todavía están, por todos los ratos vividos, porque habéis conseguido un ambiente de trabajo muy agradable, de manera que la jornada de trabajo pasa de manera amena y, en algunos momentos, incluso divertida.

A mis *projectandas*, Loli, Mónica, Almudena, Fátima y Marta por aguantarme y por haber colaborado en el trabajo que se recoge en esta memoria.

A Jos, Carmen González, Elena, Eva, Juana, Carmen Salgado, Julio y Tito, por haber sido además de compañeros de trabajo verdaderos AMIGOS.

A Jos por haberme ayudado tanto, sobre todo cuando llegué al insti, en las peleas con el AED y por hablarme aunque yo no lo hiciera.

A Carmen González por aguantarme cuando iba a darle la lata, por aquel verano mientras escribía, me he acordado mucho de ti durante estos últimos meses.

A Eva por tantas conversaciones en las largas jornadas de trabajo y por ayudarme a ver las cosas desde otro punto de vista.

A Tito por haberme escuchado y comprendido tantas veces, por los cafés y los paseos, por tantos momentos compartidos sobre todo en los últimos meses y por ayudarme este verano en Berlín.

Thanks to Kristina and Chiara for your help during my stage in Stockholm and for being my friends.



A l@s niñ@s por su amistad y porque siempre han creído en mí aunque quisiera tirar la toalla. Perdonadme por haber estado aislada del mundo estos últimos meses.

Y por último, a mi familia por su apoyo y confianza incondicional. A mis padres por su cariño y porque me han dado todo lo necesario para que pudiera hacer mi camino. A mis hermanas por haber estado ahí en todo momento y por su comprensión. A Lola por las grandes alegrías que me ha dado en estos meses.



*A mi familia*





## ÍNDICE

---



<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>I.1. CONTROL DE CONTAMINANTES MEDIOAMBIENTALES</b>	<b>3</b>
<b>I.2. EL MERCURIO</b>	<b>7</b>
I.2.1. INTERÉS MEDIOAMBIENTAL DEL MERCURIO	7
I.2.1.1. IDENTIDAD Y PROPIEDADES	7
I.2.1.2. FUENTES DE MERCURIO	9
I.2.1.3. DISTRIBUCIÓN EN EL MEDIOAMBIENTE	10
I.2.1.4. BIODISPONIBILIDAD, TOXICIDAD Y CASOS DE CONTAMINACIÓN	13
I.2.2. ESPECIACIÓN DE MERCURIO	17
I.2.2.1. PREPARACIÓN DE MUESTRAS LÍQUIDAS	19
I.2.2.1.1. Extracción con Disolventes	21
I.2.2.1.2. Destilación	21
I.2.2.1.3. Extracción Líquido-Gas (Purga y atrapado)	22
I.2.2.1.4. Extracción en Fase Sólida (SPE)	22
I.2.2.1.5. Microextracción en Fase Sólida (SPME)	24
I.2.2.2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS SÓLIDAS	30
I.2.2.2.1. Lixiviación Ácida	32
I.2.2.2.2. Hidrólisis Alcalina	33
I.2.2.2.3. Destilación	34
I.2.2.2.4. Extracción Asistida por Ultrasonidos (USE)	35
I.2.2.2.5. Extracción Asistida por Microondas (MAE)	35
I.2.2.2.6. Extracción con Fluidos Supercríticos (SFE)	37
I.2.2.2.7. Preconcentración y Limpieza	47
I.2.2.3. DERIVATIZACIÓN	48
I.2.2.3.1. Formación de haluros más volátiles	49
I.2.2.3.2. Generación de hidruros	50
I.2.2.3.3. Reactivos de Grignard	50
I.2.2.3.4. Tetra alquil-/aril- Boratos	51

1.2.2.3.5. Formación de quelatos	53
1.2.2.4. SEPARACIÓN Y DETECCIÓN	53
1.2.2.4.1. Cromatografía de Gases (GC)	54
1.2.2.4.2. Cromatografía Líquida (LC)	58
1.2.2.4.3. Electroforesis Capilar (CE)	60
1.2.2.5. PROBLEMAS EN LA ESPECIACIÓN	60
<b>I.3. CONTAMINANTES ORGÁNICOS</b>	<b>81</b>
1.3.1. INTERÉS MEDIOAMBIENTAL	81
1.3.1.1. IDENTIDAD Y PROPIEDADES	82
1.3.1.1.1. Plaguicidas Organoclorados (OCPs)	82
1.3.1.1.2. Bifenilos Policlorados (PCBs)	85
1.3.1.1.3. Bifenilos Polibromados (PBBs) y Éteres de Difenilo Polibromados (PBDEs)	88
1.3.1.1.4. Ésteres Organofosforados (TAPs)	93
1.3.1.2. FUENTES Y DISTRIBUCIÓN EN EL MEDIOAMBIENTE	96
1.3.1.3. BIODISPONIBILIDAD Y TOXICIDAD	101
1.3.2. DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES ORGÁNICOS	103
1.3.2.1. PREPARACIÓN DE MUESTRAS LÍQUIDAS	105
1.3.2.1.1. Extracción Líquido-Líquido (LLE)	105
1.3.2.1.2. Extracción en Fase Sólida (SPE)	107
1.3.2.1.3. Microextracción en Fase Sólida (SPME)	109
1.3.2.2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS SÓLIDAS	113
1.3.2.2.1. Extracción Soxhlet (SOX)	113
1.3.2.2.2. Extracción Asistida por Ultrasonidos (USE)	115
1.3.2.2.3. Dispersión de la Matriz en Fase Sólida (MSPD)	116
1.3.2.2.4. Extracción Asistida por Microondas (MAE)	117
1.3.2.2.5. Extracción con Fluidos Supercríticos (SFE)	118
1.3.2.2.6. Extracción Acelerada con Disolventes (ASE)	119
1.3.2.3. LIMPIEZA DE LOS EXTRACTOS	127



I.3.2.3.1. Tratamientos no destructivos	128
I.3.2.3.2. Tratamientos destructivos	130
I.3.2.4. SEPARACIÓN Y DETECCIÓN	131
I.3.2.4.1. Cromatografía de Gases (GC)	131
I.3.2.4.2. Cromatografía Líquida (LC)	135
<b>I.4. PLANIFICACIÓN DE EXPERIENCIAS EN QUÍMICA ANALÍTICA</b>	<b>149</b>
I.4.1. PLANIFICACIÓN DE EXPERIENCIAS: ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	150
I.4.2. OBJETIVOS DEL DISEÑO EXPERIMENTAL	152
I.4.2.1. INVESTIGACIÓN EXPLORATORIA	152
I.4.2.2. CRIBADO DE FACTORES	153
I.4.2.3. ESTUDIOS CUANTITATIVOS DE LOS FACTORES	153
I.4.2.4. ESTUDIOS CUANTITATIVOS DE LAS RESPUESTAS	153
I.4.3. OPTIMIZACIÓN DE PROCESOS	154
I.4.3.1. DISEÑOS SECUENCIALES	154
I.4.3.2. DISEÑOS SIMULTÁNEOS	155
I.4.3.3. OPTIMIZACIÓN MULTICRITERIO: FUNCIÓN DE DESEABILIDAD	156
I.4.4. COMPOSICIÓN ESTRATÉGICA DE MUESTRA	157
I.4.4.1. USO DE MATRICES SUPERSATURADAS	158
 <b>II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>	 <b>163</b>
 <b>III. MEDIOS EXPERIMENTALES</b>	 <b>169</b>
<b>III.1. DISOLVENTES, REACTIVOS Y GASES</b>	171
<b>III.2. PATRONES Y MATERIALES DE REFERENCIA</b>	172
<b>III.3. MATERIAL</b>	175
<b>III.4. INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA</b>	177
<b>III.5. SOFTWARE</b>	178
<b>III.6. LAVADO DEL MATERIAL</b>	178

<b>IV. RESULTADOS E DISCUSIÓN</b>	<b>181</b>
<b>IV.1. DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE MERCURIO EN MUESTRAS ACUOSAS MEDIANTE MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA Y CROMATOGRAFÍA DE GASES CON COLUMNA MULTICAPILAR</b>	<b>183</b>
IV.1.1. MATERIAL Y MÉTODOS	183
IV.1.1.1. PATRONES	183
IV.1.1.2. OTRAS DISOLUCIONES	184
IV.1.1.3. CONDICIONES INSTRUMENTALES DE MEDIDA	185
IV.1.1.4. PREPARACIÓN DE MUESTRAS	186
IV.1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	188
IV.1.2.1. OPTIMIZACIÓN CON LAS CONDICIONES DE DETECCIÓN SIMULTÁNEA DE ESPECIES DE Hg Y Sn	188
IV.1.2.2. IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE DETECCIÓN	192
IV.1.2.3. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE DERIVATIZACIÓN/ EXTRACCIÓN PARA LAS ESPECIES DE Hg	194
IV.1.2.4. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	199
IV.1.2.5. APLICACIÓN A MUESTRAS REALES	200
IV.1.2.5.1. Estudio del efecto salino	202
<b>IV.2. DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE MERCURIO EN MUESTRAS BIOLÓGICAS Y SEDIMENTOS MEDIANTE MAE-DERIVATIZACIÓN-SPME Y CROMATOGRAFÍA DE GASES CON ESPECTROMETRÍA DE EMISIÓN ATÓMICA</b>	<b>207</b>
IV.2.1. MATERIAL Y MÉTODOS	208
IV.2.1.1. PATRONES	208
IV.2.1.2. OTRAS DISOLUCIONES	208
IV.2.1.3. MUESTRAS	209
IV.2.1.4. CONDICIONES INSTRUMENTALES DE MEDIDA	211
IV.2.1.5. PREPARACIÓN DE MUESTRAS	212
IV.2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	214

IV.2.2.1. IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS	214
IV.2.2.2. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE DERIVATIZACIÓN/SPME	215
IV.2.2.3. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE LIXIVIACIÓN	223
IV.2.2.4. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	233
IV.2.2.5. APLICACIÓN A MATERIALES DE REFERENCIA Y MUESTRAS REALES	236
<b>IV.3. DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS ORGANOCOLORADOS EN AGUA. MONITORIZACIÓN MEDIANTE COMPOSICIÓN ESTRATÉGICA DE MUESTRAS</b>	<b>243</b>
IV.3.1. MATERIAL Y MÉTODOS	244
IV.3.1.1. PATRONES	244
IV.3.1.2. MUESTRAS	245
IV.3.1.3. OTRAS DISOLUCIONES	245
IV.3.1.4. CONDICIONES INSTRUMENTALES DE MEDIDA	245
IV.3.1.5. EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS	246
IV.3.1.5.1. Cartuchos de carbón grafitizado (GCB) ENVI-Carb	247
IV.3.1.5.2. Cartuchos de divinilbenceno-N-vinilpirrolidona (DVB-VP) OASIS HLB	249
IV.3.1.6. MATRIZ DE EXPERIENCIAS. PREPARACIÓN DE MUESTRAS	250
IV.3.1.6.1. Lote 1: Matriz 12x30	253
IV.3.1.6.2. Lote 2: Matriz 12x24	254
IV.3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	255
IV.3.2.1. IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS	255
IV.3.2.2. VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS	256
IV.3.2.3. COMPOSICIÓN DE MUESTRAS	258
IV.3.2.3.1. Análisis de muestras individuales	259
IV.3.2.3.2. Análisis de las muestras compuestas	261
IV.3.2.3.3. Comparación de los resultados	266

<b>IV.4. DETERMINACIÓN DE PIORRETARDANTES ORGANOFOSFORADOS Y PLASTIFICANTES Y DE SUS POSIBLES PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN EN AGUAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA-ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM</b>	<b>279</b>
IV.4.1. MATERIAL Y MÉTODOS	280
IV.4.1.1. PATRONES	280
IV.4.1.2. HIDRÓLISIS QUÍMICA DE LOS TRIÉSTERES DEL ÁCIDO FOSFÓRICO	281
IV.4.1.3. MUESTRAS	282
IV.4.1.4. OTRAS DISOLUCIONES	282
IV.4.1.5. CONDICIONES INSTRUMENTALES DE MEDIDA	282
IV.4.1.5.1. Separación y detección de los piorretardantes fosforados	283
IV.4.1.5.2. Separación y detección de los productos de hidrólisis	285
IV.4.1.6. PREPARACIÓN DE MUESTRAS	288
IV.4.1.6.1. Extracción de los piorretardantes organofosforados	289
IV.4.1.6.2. Extracción de los productos de hidrólisis	290
IV.4.1.7. ESTUDIO DE BIODEGRADACIÓN	291
IV.4.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	291
IV.4.2.1. RESULTADOS DE LA HIDRÓLISIS QUIMICA	291
IV.4.2.2. OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE DETECCIÓN ESI-MS/MS	292
IV.4.2.2.1. Optimización y espectro de MS/MS para los ésteres tri-sustituidos	292
IV.4.2.2.2. Optimización y espectro de MS/MS para los ésteres mono- y di-sustituidos	297
IV.4.2.3. OPTIMIZACIÓN DE LA FASE MÓVIL E IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS	301
IV.4.2.3.1. Optimización de la separación de los TAPs	301

IV.4.2.3.2. Optimización de separación de ésteres mono- /di-sustituidos	303
IV.4.2.4. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN (SPE)	305
IV.4.2.4.1. Extracción de TAPs mediante SPE	305
IV.4.2.4.2. Extracción de los dialquil-/arilfosfatos mediante SPE	308
IV.4.2.5. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE MATRIZ	310
IV.4.2.6. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	312
IV.4.2.6.1. Estudio de los parámetros analíticos para los TAPs	312
IV.4.2.6.2. Estudio de los parámetros analíticos para los DAPs	315
IV.4.2.7. APLICACIÓN A MUESTRAS REALES	317
IV.4.2.8. ESTUDIO DE BIODEGRADACIÓN	321
<b>IV.5. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS CLORADOS Y BROMADOS EN MUESTRAS DE ACUICULTURA</b>	<b>325</b>
IV.5.1. MATERIAL Y MÉTODOS	326
IV.5.1.1. PATRONES	326
IV.5.1.2. MUESTRAS	327
IV.5.1.3. ADSORBENTES	328
IV.5.1.4. CONDICIONES INSTRUMENTALES DE MEDIDA	328
IV.5.1.4.1. Cromatografía de Gases con Detección por Captura Electrónica (GC-ECD)	328
IV.5.1.4.2. Cromatografía de Gases acoplada con Espectrometría de Masas (GC-MS y GC-MS/MS)	329
IV.5.2.5. PREPARACIÓN DE MUESTRAS	332
IV.5.1.5.1. Extracción con Fluidos Supercríticos (SFE)	332
IV.5.1.5.2. Dispersión de la Matriz en Fase Sólida (MSPD)	333
IV.5.1.5.3. Microextracción en Fase Sólida (SPME)	334
IV.5.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	335

IV.5.2.1. IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS	335
IV.5.2.1.1. Cromatografía de Gases con Detección de Captura Electrónica (GC-ECD)	335
IV.5.2.1.2. Cromatografía de Gases -Espectrometría de Masas (GC-MS)	336
IV.5.2.1.3. Cromatografía de Gases -Espectrometría de Masas en tándem (GC-MS/MS)	341
IV.5.2.2. VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS DE DETERMINACIÓN	343
IV.5.2.3. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN/ LIMPIEZA MEDIANTE SFE	346
IV.5.2.3.1. Estudio de la homogeneidad del pienso	346
IV.5.2.3.2. Estudio de la limpieza	347
IV.5.2.3.3. Optimización de las condiciones de SFE	350
IV.5.2.4. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE MSPD	359
IV.5.2.5. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE SPME	363
IV.5.2.6. VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS	369
IV.5.2.7. APLICACIÓN A MUESTRAS REALES	374
<b>V. CONCLUSIONES</b>	<b>383</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>391</b>
A.I. Espectros de masas en tándem (Electrospray) de ésteres del ácido fosfórico	393
A.II. Espectros de masas y masas en tándem (Impacto Electrónico) de los contaminantes halogenados	409
A.III. Acrónimos	433

Tabla I.2.1. Principales especies de mercurio en el medio ambiente	8
Tabla I.2.2. Fuentes de mercurio medioambiental	9
Tabla I.2.3. Absorción de las especies de mercurio por vías	13
Tabla I.2.4. Resumen de métodos de determinación de especies de mercurio en muestras acuosas	26
Tabla I.2.5. Resumen de métodos de determinación de especies de mercurio en muestras de sedimentos	38
Tabla I.2.6. Resumen de métodos de determinación de especies de mercurio en muestras de material biológico	40
Tabla I.2.7. Principales agentes derivatizantes	49
Tabla I.3.1. Principales propiedades físicas de los plaguicidas estudiados	84
Tabla I.3.2. Isómeros de los PCBs y su nomenclatura según la IUPAC	86
Tabla I.3.3. Principales propiedades físicas de los PCBs estudiados	87
Tabla I.3.4. Composición de las mezclas comerciales de PBDEs	92
Tabla I.3.5. Principales propiedades físicas de los PBBs y PBDEs estudiados	92
Tabla I.3.6. Principales propiedades físicas de los TAPs estudiados	96
Tabla I.3.7. Uso de los contaminantes orgánicos estudiados	97
Tabla I.3.8. Clasificación de la toxicidad: escala de Hodge y Sterner	102
Tabla I.3.9. Toxicidad de los contaminantes orgánicos estudiados	103
Tabla I.3.10. Resumen de métodos de determinación de los compuestos orgánicos estudiados en muestras acuosas	111
Tabla I.3.11. Resumen de métodos de determinación de los compuestos orgánicos estudiados en muestras de sedimentos	121
Tabla I.3.12. Resumen de métodos de determinación de los compuestos orgánicos estudiados en muestras de material biológico	123
Tabla IV.1.1. Condiciones experimentales de medida del sistema GC-MIP-AES para la determinación de compuestos etilados de mercurio y estaño	185
Tabla IV.1.2. Dominio experimental de los factores seleccionados en el diseño experimental $2^3+2$ para la optimización de las condiciones de detección del sistema GC-MIP-AES	189

Tabla IV.1.3. Matriz de experiencias y respuestas obtenidas para las especies de mercurio y estaño (cuentas de área) del diseño experimental $2^3+2$ para la optimización de las condiciones de detección del sistema GC-MIP-AES	189
Tabla IV.1.4. Tiempos de retención de los compuestos de mercurio y estaño	192
Tabla IV.1.5. Parámetros de validación del método de determinación de los compuestos etilados de mercurio y estaño mediante inyección directa	194
Tabla IV.1.6. Dominio experimental de los factores seleccionados en el diseño experimental $2^3+2$ para la optimización de las condiciones de SPME	197
Tabla IV.1.7. Matriz de experiencias y respuestas obtenidas para las especies de mercurio (cuentas de área) del diseño experimental $2^3+2$ para la optimización de las condiciones de SPME	197
Tabla IV.1.8. Condiciones óptimas de extracción mediante SPME	199
Tabla IV.1.9. Parámetros de validación del método de determinación de los compuestos etilados de mercurio mediante SPME-GC-MIP-AES	200
Tabla IV.1.10. Resultado del análisis de especies de mercurio ( $60 \text{ ng.L}^{-1}$ ) en agua de río	201
Tabla IV.1.11. Resultado del análisis de especies de mercurio ( $100 \text{ ng.L}^{-1}$ ) en agua de mar	201
Tabla IV.2.1. Condiciones experimentales de medida del sistema GC-MIP-AES para la determinación de compuestos fenilados de mercurio	211
Tabla IV.2.2. Tiempos de retención de los compuestos de mercurio como especies feniladas	214
Tabla IV.2.3. Dominio experimental de los factores seleccionados en el diseño experimental central compuesto para la optimización del proceso de SPME	217
Tabla IV.2.4. Matriz de experiencias y respuestas obtenidas para las especies de mercurio del diseño experimental central compuesto para la optimización de las condiciones de SPME	218
Tabla IV.2.5. Dominio experimental de los factores seleccionados en el diseño experimental factorial fraccionado $2^{5-1}$ para la optimización del proceso de lixiviación	224
Tabla IV.2.6. Matriz de experiencias y respuestas obtenidas para las especies de mercurio del diseño experimental factorial fraccionado $2^{5-1}$ para la optimización de las condiciones de lixiviación	225



Tabla IV.2.7. Dominio experimental de los factores seleccionados en el diseño experimental central compuesto para la optimización de las condiciones de MAE	228
Tabla IV.2.8. Matriz de experiencias y respuestas obtenidas para las especies de mercurio del diseño experimental central compuesto con 3 puntos centrales	229
Tabla IV.2.9. Estimaciones de los coeficientes para las especies de mercurio del diseño experimental central compuesto con 3 puntos centrales	230
Tabla IV.2.10. Parámetros de calibración de la determinación de los compuestos de mercurio en material biológico	234
Tabla IV.2.11. Parámetros de calibración de la determinación de los compuestos de mercurio en sedimentos	234
Tabla IV.2.12. Parámetros de validación del método de determinación de los compuestos de mercurio	235
Tabla IV.2.13. Resultado del análisis metilmercurio en diversos materiales biológicos de origen marino	236
Tabla IV.2.14. Resultado del análisis mercurio total en diversos materiales biológicos de origen marino	237
Tabla IV.2.15. Resultado del análisis de metilmercurio en materiales de referencia de sedimentos	239
Tabla IV.2.16. Resultado del análisis de mercurio total en materiales de referencia de sedimentos	239
Tabla IV.3.1. Condiciones experimentales de medida del sistema GC-ECD para la determinación de plaguicidas organoclorados	246
Tabla IV.3.2. Matriz supersaturada 12x30	251
Tabla IV.3.3. Matriz supersaturada 12x24	252
Tabla IV.3.4. Tiempos de retención de los plaguicidas organoclorados estudiados	255
Tabla IV.3.5. Parámetros de validación del método de determinación de los plaguicidas organoclorados mediante SPE con cartuchos ENVI-Carb y GC-ECD	257
Tabla IV.3.6. Parámetros de validación del método de determinación de los plaguicidas organoclorados mediante SPE con cartuchos OASIS HLB y GC-ECD	258
Tabla IV.3.7. Resultados obtenidos en el análisis de las muestras individuales contaminadas del lote 1	259

Tabla IV.3.8. Resultados obtenidos en el análisis de las muestras individuales contaminadas del lote 2	260
Tabla IV.3.9. Resultados obtenidos en el análisis de las muestras compuestas de la matriz 12x30	263
Tabla IV.3.10. Resultados obtenidos en el análisis de las muestras compuestas de la matriz 12x24	263
Tabla IV.3.11. Resultados de concentración de las muestras individuales obtenidos en el tratamiento de las muestras compuestas de la matriz 12x30 mediante Gamich	264
Tabla IV.3.12. Resultados de concentración de las muestras individuales obtenidos en el tratamiento de las muestras compuestas de la matriz 12x24 mediante Gamich	265
Tabla IV.3.13. Evaluación de la eficiencia de las predicciones mediante la composición estratégica de muestras para las muestras del lote 1 y 2, teniendo en cuenta diferentes criterios	275
Tabla IV.4.1. Condiciones experimentales de la separación mediante LC para la determinación de los piroretardantes organofosforados	283
Tabla IV.4.2. Parámetros comunes óptimos del sistema ESI-MS/MS para la determinación de piroretardantes organofosforados	284
Tabla IV.4.3. Parámetros individuales óptimos del sistema ESI-MS/MS para la determinación de piroretardantes organofosforados	284
Tabla IV.4.4. Condiciones experimentales de la separación mediante LC para la determinación diéster- y monoéster del ácido fosfórico	286
Tabla IV.4.5. Parámetros comunes óptimos del sistema ESI-MS/MS para la determinación de los mono- y diésteres del ácido fosfórico	286
Tabla IV.4.6. Parámetros individuales óptimos del sistema ESI-MS/MS para la determinación de mono-/diésteres del ácido fosfórico	287
Tabla IV.4.7. Comparación de las recuperaciones (%) de SPE y efecto matriz en muestras de agua para los cartuchos Lichrolut RP-18 y Oasis HLB	307
Tabla IV.4.8. Comparación de las recuperaciones (%) de SPE y efecto matriz en muestras de agua para los cartuchos Oasis HLB y Lichrolut RP-18, en fase reversa o por par iónico	309
Tabla IV.4.9. Parámetros de validación del método LC-MS/MS en modo positivo para los TAPs	313

Tabla IV.4.10. Estudio de la recuperación y de los límites de detección del procedimiento SPE-LC-MS/MS para TAPs	315
Tabla IV.4.11. Parámetros de validación del método LC-MS/MS en modo positivo para los DAPs y MAPs	316
Tabla IV.4.12. Estudio de la recuperación y de los límites de detección del procedimiento SPE-LC-MS/MS para la determinación de DAPs y MAPs	317
Tabla IV.4.13. Concentración de los TAPs encontrados en las aguas de una planta municipal de tratamiento de aguas residuales	318
Tabla IV.4.14. Concentración de los productos de hidrólisis en las aguas de una planta municipal de tratamiento de aguas residuales	319
Tabla IV.5.1. Condiciones experimentales de medida del sistema GC-ECD	329
Tabla IV.5.2. Condiciones experimentales de medida del sistema GC-MS y GC-MS/MS	330
Tabla IV.5.3. Condiciones de mediada específicas para cada compuesto mediante GC-MS/MS	331
Tabla IV.5.4. Tiempos de retención de los compuestos estudiados mediante GC-ECD	335
Tabla IV.5.5. Tiempos de retención e iones de cuantificación de los compuestos estudiados mediante GC-MS	337
Tabla IV.5.6. Parámetros del método de determinación de contaminantes halogenados mediante GC-ECD	343
Tabla IV.5.7. Parámetros del método de determinación de contaminantes halogenados mediante GC-MS	344
Tabla IV.5.8. Parámetros del método de determinación de contaminantes halogenados mediante GC-MS/MS	345
Tabla IV.5.9. Dominio experimental de los factores seleccionados en el diseño experimental $2^{5-1}$ para la estudio de las condiciones de SFE	351
Tabla IV.5.10. Matriz de experiencias del diseño $2^{5-1}$	351
Tabla IV.5.11. Respuestas obtenidas del diseño experimental $2^{5-1}$	352
Tabla IV.5.12. Dominio experimental de los factores seleccionados en el diseño experimental Doehlert	355
Tabla IV.5.13. Matriz de experiencias del diseño Doehlert	356
Tabla IV.5.14. Respuestas obtenidas con el diseño experimental Doehlert	357

## ÍNDICE TABLAS

---

Tabla IV.5.15. Dominio experimental de los factores seleccionados en el diseño experimental $2^{23}2$	360
Tabla IV.5.16. Matriz de experiencias del diseño $2^{23}2$	360
Tabla IV.5.17. Respuestas obtenidas del diseño experimental $2^{23}2$	361
Tabla IV.5.18. Dominio experimental de los factores seleccionados en el diseño experimental Doehlert para la optimización de la SPME	366
Tabla IV.5.19. Matriz de experiencias del diseño Doehlert	366
Tabla IV.5.20. Respuestas obtenidas del diseño Doehlert para la optimización de la SPME	367
Tabla IV.5.21. Parámetros del método de extracción mediante SFE de contaminantes halogenados mediante GC-MS/MS	370
Tabla IV.5.22. Parámetros del método de extracción mediante MSPD de contaminantes halogenados mediante GC-MS/MS	371
Tabla IV.5.23. Parámetros del método de extracción mediante SFE-SPME de contaminantes halogenados mediante GC-MS/MS	372
Tabla IV.5.24. Análisis del material de referencia IAEA 406 (n=6)	373
Tabla IV.5.25. Análisis de muestras reales mediante SFE y GC-MS/MS	375
Tabla IV.5.26. Análisis de muestras reales mediante MSPD y GC-MS/MS	376
Tabla IV.5.27. Análisis de muestras reales mediante SFE-SPME y GC-MS/MS	377

Figura I.2.1. Ciclo biogeoquímico del mercurio	11
Figura I.2.2. Técnicas de preparación de muestra para el análisis de especiación de mercurio en muestras acuosas	20
Figura I.2.3. Técnicas de preparación de muestra para el análisis de especiación de mercurio en muestras sólidas	32
Figura I.2.4. Corte de una columna multicapilar	55
Figura I.3.1. Estructura química de los plaguicidas organoclorados estudiados	83
Figura I.3.2. Estructura general de los bifenilos policlorados	86
Figura I.3.3. Estructura general de los PBBs y PBDEs	89
Figura I.3.4. Reparto del consumo mundial de piroretardantes en el 2001	90
Figura I.3.5. Estructura de los TAPs estudiados	94
Figura I.3.6. Distribución en el medioambiente de los contaminantes orgánicos	99
Figura I.3.7. Esquema de los procedimientos de determinación de los contaminantes orgánicos	104
Figura IV.1.1. Esquema de preparación de muestra para la determinación de especies de mercurio en agua	187
Figura IV.1.2. Gráfico Pareto de efectos principales estandarizados para la optimización de las condiciones de detección del sistema GC-MIP-AES	191
Figura IV.1.3. Estudio univariante de la presión de helio en cabeza de columna	192
Figura IV.1.4. Cromatograma de GC-MIP-AES para la determinación simultánea de los compuestos de mercurio y estaño como especies etiladas (inyección directa)	193
Figura IV.1.5. Perfiles de la influencia de la concentración de agente derivatizante	195
Figura IV.1.6. Cromatogramas de GC-MIP-AES de la línea de emisión de Hg a 254 nm con diferentes concentraciones de agente derivatizante.	196
Figura IV.1.7. Gráfico Pareto de efectos principales estandarizados para la optimización de las condiciones de SPME	198

## ÍNDICE FIGURAS

---

Figura IV.1.8. Cinética de extracción en espacio de cabeza obtenida con agitación magnética y un volumen de muestra de 14 mL	199
Figura IV.1.9. Perfiles de la influencia de la concentración de NaCl	202
Figura IV.1.10. Cinética de extracción en agua salada a diferentes temperaturas	203
Figura IV.2.1. Esquema de preparación de muestra para la determinación de especies de mercurio en muestras de material biológico y sedimentos	213
Figura IV.2.2. Cromatograma de GC-MIP-AES (línea de emisión de Hg a 254 nm) para la determinación de los compuestos de mercurio (1 ng.mL <sup>-1</sup> ) como especies feniladas (SPME)	215
Figura IV.2.3. Comparación de la respuesta obtenida por GC-MIP-AES de las especies de mercurio (1 ng.mL <sup>-1</sup> ) en diferentes condiciones de derivatización/SPME	216
Figura IV.2.4. Gráfico Lenth de efectos principales e interacciones estandarizados del diseño experimental central compuesto	219
Figura IV.2.5. Superficie de respuesta de la temperatura de extracción frente al tiempo de extracción	220
Figura IV.2.6. Funciones de deseabilidad individual para la optimización de SPME	221
Figura IV.2.7. Funciones de deseabilidad global bidimensionales para la optimización de SPME	222
Figura IV.2.8. Perfiles de los coeficientes de variación (%) con el tamaño de muestra en sedimentos para MeHg <sup>+</sup> y Hg <sup>2+</sup>	223
Figura IV.2.9. Gráfico Lenth de efectos principales e interacciones del diseño factorial fraccionado 2 <sup>5-1</sup>	226
Figura IV.2.10. Gráficos de interacciones del diseño factorial fraccionado 2 <sup>5-1</sup>	227
Figura IV.2.11. Superficie de respuesta del tiempo de extracción frente a la concentración del ácido para metilmercurio	231
Figura IV.2.12. Funciones de deseabilidad individual para la optimización de las condiciones de MAE	231
Figura IV.2.13. Funciones de deseabilidad global bidimensionales para la optimización de las condiciones de MAE	232

Figura IV.2.14. Cromatograma de GC-MIP-AES (línea de emisión de Hg a 254 nm) para la determinación de los compuestos de mercurio como especies feniladas en una muestra de TORT-1 con patrón interno	237
Figura IV.2.15. Cromatograma de GC-MIP-AES (línea de emisión de Hg a 254 nm) para la determinación de los compuestos de mercurio como especies feniladas en una muestra de material de referencia CRM 580	238
Figura IV.3.1. Esquema de preparación de muestra para la determinación de plaguicidas organoclorados en agua	247
Figura IV.3.2. Esquema del montaje para la extracción con cartuchos ENVI-Carb	248
Figura IV.3.3. Esquema del montaje para la extracción con cartuchos OASIS HLB	250
Figura IV.3.4. Cromatograma de GC-ECD para la identificación de los plaguicidas organoclorados (50 ng.mL <sup>-1</sup> )	256
Figura IV.3.5. Equipo para la preparación automática de las muestras compuestas	262
Figura IV.3.6. Resultados comparativos en el lote 1	267
Figura IV.3.7. Resultados comparativos en el lote 2	271
Figura IV.4.1. Esquema de preparación de muestra	288
Figura IV.4.2. Optimización del voltaje del cono de ESI del TnBP (m/z 267)	293
Figura IV.4.3. Optimización de la energía de colisión de MS/MS para el TnBP	294
Figura IV.4.4. Esquema de la fragmentación del TnBP	295
Figura IV.4.5. Esquema de la fragmentación del TPhP	296
Figura IV.4.6. Esquema de la fragmentación del BDP	297
Figura IV.4.7. Optimización del voltaje del cono de ESI (modo negativo) del MPhP (m/z 173)	298
Figura IV.4.8. Optimización de la energía de colisión de MS/MS para el MPhP	299
Figura IV.4.9. Esquema de la fragmentación del DnBP	300
Figura IV.4.10. Esquema de la fragmentación del DCPD	300
Figura IV.4.11. Esquema de la fragmentación del DPhP	301
Figura IV.4.12. Influencia de la concentración de ácido fórmico en la respuesta media de todos los compuestos	302

Figura IV.4.13. Cromatograma de LC-ESI-MS/MS de un patrón de 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de TAPs	303
Figura IV.4.14. Influencia de la concentración de tributilamina en la respuesta media de todos los compuestos	304
Figura IV.4.15. Cromatograma de LC-ESI-MS/MS de una mezcla de los ésteres mono-/di-sustituídos obtenidos como producto de hidrólisis	305
Figura IV.4.16. Estudio del volumen de elución para el TPPO	306
Figura IV.4.17. Estudio del volumen de elución para el DnBP	308
Figura IV.4.18. Estudio de los efectos de matriz en LC-ESI-MS/MS de los TAPs	311
Figura IV.4.19. Estudio de los efectos de matriz en LC-ESI-MS/MS de DAPs	312
Figura IV.4.20. Cromatograma de una muestra de agua residual tratada, mediante SPE-LC-MS/MS, para la determinación de TAPs	320
Figura IV.4.21. Cromatograma de una muestra de agua residual, mediante SPE-LC-MS/MS, para la determinación de los productos de hidrólisis de los TAPs	321
Figura IV.4.22. Patrón de degradación de los ésteres de fosfato tri-sustituídos en la prueba de degradación	322
Figura IV.5.1. Esquema del llenado de una celda del SFE	333
Figura IV.5.2. Esquema de la jeringa de MSPD	334
Figura IV.5.3. Cromatograma de GC-ECD para la determinación de especies halogenadas (50 $\text{ng.mL}^{-1}$ )	336
Figura IV.5.4. Cromatogramas de GC-MS para la determinación de especies halogenadas (100 $\text{ng.mL}^{-1}$ )	338
Figura IV.5.5. Cromatogramas de GC-MS/MS para la determinación de especies halogenadas (50 $\text{ng.mL}^{-1}$ )	342
Figura IV.5.6. Estudio de la homogeneidad del pienso preparado	347
Figura IV.5.7. Estudio del % de grasa en el extracto usando diferentes adsorbentes	348
Figura IV.5.8. Estudio de la limpieza con diferentes adsorbentes	349
Figura IV.5.9. Gráfico Lenth de efectos principales e interacciones	355
Figura IV.5.10. Superficie de respuesta del tiempo de extracción dinámica frente a la presión	358



Figura IV.5.11. Funciones de deseabilidad global, gráfico bidimensional y tridimensional	359
Figura IV.5.12. Gráfica de efectos totales	362
Figura IV.5.13. Estudio de la limpieza con diferentes adsorbentes	363
Figura IV.5.14. Estudio del modo de SPME	364
Figura IV.5.15. Estudio del tiempo de extracción de SPME a 75 °C	365
Figura IV.5.16. Gráfica de superficies de respuesta	368
Figura IV.5.17. Gráfica de deseabilidad global	369
Figura IV.5.18. Cromatograma de un extracto de una muestra de berberecho obtenido mediante GC-MS/MS, extraída mediante MSPD	379
Figura IV.5.19. Cromatograma de una muestra de almeja obtenido mediante GC-MS/MS, extraída mediante SFE-SPME	380





## I. INTRODUCCIÓN

---



## **I.1. CONTROL DE CONTAMINANTES MEDIOAMBIENTALES**

Este trabajo se centra en el desarrollo de nuevas estrategias de preparación de muestra para el control de contaminantes medioambientales en el medio acuático.

Las muestras medioambientales están normalmente contaminadas con una gran variedad de compuestos. El problema general que se presenta en el análisis de estas muestras es el gran número de componentes de la matriz que podrían interferir en el análisis cuantitativo<sup>1</sup>. Por lo tanto, el control medioambiental se basa en el desarrollo de métodos analíticos que eviten los problemas en la detección, mejoren el control de calidad y garanticen la fiabilidad de los resultados del proceso analítico, de manera que permitan conocer el nivel de persistencia de un cierto compuesto.

Actualmente, en la sociedad hay un aumento de la conciencia pública sobre la presencia de contaminantes en el medio ambiente y en las fuentes de alimentos. Es muy importante estudiar la presencia de contaminantes en el medio acuático, tanto en agua, como en sedimentos y organismos vivos, ya que la mayoría tienden a bioacumularse en los tejidos grasos de los organismos acuáticos, como peces, y se biomagnifican a lo largo de la cadena alimenticia. Por lo que, los consumidores de estos productos, incluyendo los humanos, podrían verse afectados por los efectos de estos contaminantes<sup>2</sup>.

En las últimas décadas, debido al aumento en la demanda por la población mundial, se ha producido un aumento de la producción de peces de granja, es decir, de la acuicultura<sup>3</sup>. Por lo tanto, para prevenir

potenciales riesgos para la salud humana, además del estudio de estos contaminantes en el medio natural, es necesaria su monitorización en medios controlados para identificar su origen. Por ejemplo, los piensos empleados en la acuicultura pueden suponer un camino potencial de introducción directa de contaminantes en peces<sup>4</sup>.

Los contaminantes medioambientales incluyen una multitud de compuestos químicos que pueden clasificarse según su origen, natural o antropogénico, y según su naturaleza química, inorgánica u orgánica<sup>5</sup>.

Así, algunos compuestos pueden aparecer de manera natural en el medioambiente, otros pueden producirse comercialmente debido a su actividad sobre los seres vivos, como plaguicidas, o con fines industriales, como PCBs, y otros pueden producirse como subproductos no deseados. Además, algunos compuestos pueden tener varios orígenes: naturales y antropogénicos.

Los contaminantes inorgánicos son principalmente aniones, gases y metales pesados. Algunos de estos metales (Hg, Sn, Pb) pueden sufrir procesos metabólicos en los seres vivos dando lugar a compuestos organometálicos. Existe una gran variedad de contaminantes orgánicos que comprenden desde aceites y/o grasas hasta plaguicidas o PCBs.

Muchos de estos compuestos son peligrosos ya que son cancerígenos y/o son disruptores endocrinos<sup>6</sup> (EDs), es decir, son sustancias que actúan de manera similar a algunas hormonas alterando las rutas metabólicas naturales de los seres vivos.

Para el desarrollo de este trabajo se han seleccionado los siguientes grupos de contaminantes:

- Mercurio y sus derivados orgánicos,
- Compuestos organohalogenados: plaguicidas organoclorados, bifenilos policlorados, bifenilos polibromados y éteres de difenilo polibromados,
- Compuestos organofosforados: triarilfosfatos, triarilfosfatos y bisfosfatos.

- 
1. Eljarrat, E.; de la Cal, A.; Barceló, D., *J. Chromatogr. A* **1008** (2003) 181–192.
  2. Baird, C., “Química Ambiental”, Ed. Reverté, Barcelona (2001). pg. 299–366.
  3. Serrano, R.; Barreda, M.; Pitarch, E.; Hernández, F., *J. Sep. Sci.* **26** (2003) 75–86.
  4. Gfrerer, M.; Chen, S.; Lankmayr, E.P.; Quan, X.; Yang, F., *Anal. Bioanal. Chem.* **378** (2004) 1861–1867.
  5. Pérez-Bendito, D.; Rubio, S., “Environmental Analytical Chemistry”, de “Comprehensive Analytical Chemistry”, Ed. Elsevier, Amsterdam (1999).
  6. “European Workshop on the impact of Endocrine Disrupters on Human Health and Wildlife”. Report of the Proceedings, 2–4, pg.125. European Commission, Weybridge, Reino Unido (1996).





## I.2. EL MERCURIO

### I.2.1. INTERÉS MEDIOAMBIENTAL DEL MERCURIO

En las últimas dos décadas el mercurio y los compuestos organomercuriales han sido muy estudiados en el medio ambiente<sup>1,2,3,4,5,6,7</sup> debido a su toxicidad, su persistencia en el medio y su tendencia a acumularse en los seres vivos. El mercurio está considerado entre los contaminantes medioambientales prioritarios, también se clasifica como disruptor endocrino. Está entre los metales traza tóxicos más bioconcentrados en la cadena alimenticia humana y, varias agencias y organizaciones nacionales e internacionales como WHO y diferentes gobiernos como el canadiense y los escandinavos, se han puesto como objetivo el control de su emisión.

#### I.2.1.1. IDENTIDAD Y PROPIEDADES

El mercurio aparece en el medio ambiente en diferentes formas incluyendo mercurio elemental ( $\text{Hg}^0$ ), especies de mercurio inorgánico ( $\text{Hg}^+$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ), y especies orgánicas [ $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5\text{Hg}^+$ ,  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Hg}^+$ ,  $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$ ] (tabla I.2.1).

Las especies de mercurio difieren mucho en propiedades pero son todas tóxicas tanto para humanos como para animales y las formas orgánicas, especialmente el metilmercurio y dimetilmercurio, presentan la mayor toxicidad.

Tabla I.2.1. Principales especies de mercurio en el medio ambiente.

Tipo	Nombre	Fórmula
Mercurio Elemental		Hg <sup>0</sup>
Especies Inorgánicas	Ión Mercúrico	Hg <sup>2+</sup>
	Ión Mercurioso	Hg <sup>+</sup>
Especies Orgánicas	Metilmercurio (MeHg <sup>+</sup> )	CH <sub>3</sub> Hg <sup>+</sup>
	Etilmercurio (EtHg <sup>+</sup> )	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> Hg <sup>+</sup>
	Fenilmercurio (PhHg <sup>+</sup> )	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Hg <sup>+</sup>
	Dimetilmercurio (Me <sub>2</sub> Hg)	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Hg

El mercurio elemental (Hg<sup>0</sup>) es un metal líquido, denso y plateado a temperatura y presión normales, se volatiliza fácilmente, emitiendo mercurio vapor, que es absorbido en los pulmones; sin embargo, el mercurio elemental se absorbe poco a través de la piel o del tracto intestinal.

El mercurio forma sales inorgánicas en dos estados iónicos, mercurio (I) y mercurio (II), que varían en solubilidad y propiedades de absorción. Las sales de mercurio (II) son mucho más comunes que las de mercurio (I) y, por lo tanto, son las que serán consideradas en este trabajo.

El mercurio también forma compuestos organometálicos, se usa la denominación compuesto "organometálico" para indicar un compuesto enlazado covalentemente, no se incluye mercurio enlazado con proteínas ni sales formadas con ácidos orgánicos. Estos compuestos son estables, exhiben gran afinidad por los grupos sulfhidrilo, la mayoría son rápidamente absorbidos a través de los pulmones y del tracto gastrointestinal y algunos son fácilmente absorbidos por la piel. Las especies de metilmercurio son neurotóxicas y es frecuente encontrarlas en

el medioambiente acuático. Debido a su afinidad por los tejidos grasos en animales, tienden a bioacumularse y biomagnificarse más fácilmente que otras especies de mercurio.

### I.2.1.2. FUENTES DE MERCURIO

El mercurio aparece en la naturaleza como forma metálica y/o sus minerales de azufre, como el cinabrio (HgS). Se estima que las emisiones de mercurio a la atmósfera por desgasificación de la corteza terrestre a través de gases volcánicos y por evaporación de los océanos son muy variables, desde 2.000–3.000 toneladas/año a 6.000 toneladas/año<sup>8,9,10</sup>.

Tabla I.2.2. Fuentes de mercurio medioambiental.

Tipo	Fuente
Natural	Erupciones volcánicas
	Meteorización de rocas
	Evaporación de los océanos
Antropogénica	Procesos industriales (proceso cloro-álcali)
	Amalgamas de Hg (empastes, extracción de oro)
	Catalizadores, Plaguicidas, Pigmentos,...
	Extracción y Calcinación de minerales de sulfuro
	Quema de combustibles fósiles
	Centrales térmicas
Incineradoras de residuos	

Las fuentes antropogénicas tanto intencionadas, manufactura de mercurio y su uso, como no intencionadas, quema de combustibles fósiles, contribuyen a la acumulación de mercurio en el medioambiente.

La producción mundial de mercurio por minería y fundición alcanzó las 10.000 toneladas en 1973<sup>11</sup> y 6.500 toneladas en 1980<sup>8</sup>. El mercurio tiene una gran variedad de usos en industria, agricultura, aplicaciones

militares, medicina y en la profesión dental como amalgamas y en la fabricación de termómetros. Los compuestos de mercurio se han usado en la producción industrial de sosa cáustica y cloro, en la industria eléctrica para la fabricación de bombillas, controladores, rectificadores, baterías e interruptores, también se han utilizado como fungicidas, herbicidas, desinfectantes y pigmentos. Las industrias de cloro y sosa cáustica, equipos eléctricos y pinturas son las mayores consumidoras de mercurio, con el 55 % del consumo total<sup>8,11</sup>.

Varias actividades humanas no relacionadas directamente al mercurio producen liberaciones sustanciales en el medioambiente. Estas incluyen la quema de combustibles fósiles, la producción de acero, cemento y fosfato, la fundición de metales de sus minerales sulfurados y la incineración de residuos urbanos y médicos. Las emisiones totales antropogénicas a la atmósfera se han estimado del orden de 2.000–3.000 toneladas/año<sup>8,9</sup>.

### **I.2.1.3. DISTRIBUCIÓN EN EL MEDIOAMBIENTE**

El ciclo biogeoquímico del mercurio se caracteriza por las diversas rutas que puede seguir en el medio ambiente, su conocimiento es de gran importancia para comprender el grado de toxicidad del mercurio y de sus compuestos. En la figura 1.2.1 se muestra un esquema del ciclo del mercurio en la naturaleza, indicando las principales reacciones que ocurren en el sedimento, agua y atmósfera, se puede ver una gran influencia de las bacterias y de la luz solar.

El vapor de mercurio emitido, tanto por fuentes antropogénicas como naturales, es poco soluble en agua, por lo que, es transportado a grandes

distancias en la atmósfera, y sólo una pequeña fracción es eliminada durante las precipitaciones. Lo más probable es que sea oxidado a  $\text{Hg}^{2+}$  por oxidantes atmosféricos, como el oxígeno, ozono y/o cloro, y, una vez convertido a  $\text{Hg}^{2+}$  es mucho más soluble y está sujeto a una mayor eliminación atmosférica por precipitación y deposición sobre el suelo y el agua. El mercurio vapor tiene un tiempo de residencia en la atmósfera de 0,4 a 3 años, mientras que las formas solubles tienen un tiempo de residencia de unas pocas semanas<sup>9</sup>.

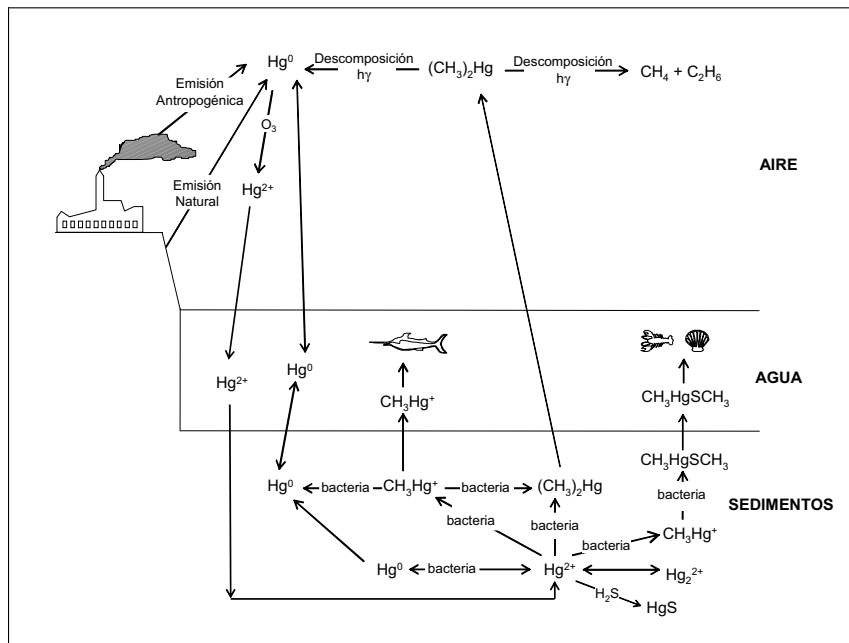


Figura I.2.1. Ciclo biogeoquímico del mercurio.

El mercurio inorgánico y elemental que llega al agua se deposita en los sedimentos, donde una parte reacciona con azufre formando el sulfuro de mercurio insoluble, mientras un pequeño porcentaje es metilado. El mercurio inorgánico y elemental puede ser metilado en condiciones aeróbicas o anaeróbicas por dos mecanismos distintos: el biológico, por medio de microorganismos y hongos, principalmente por reacción con la

## EL MERCURIO

---

metilcobalamina; y el químico o abiótico, que puede ocurrir por tres caminos, vía reacción de transmetilación, por medio de radiación ultravioleta en la presencia de compuestos orgánicos donantes del grupo metilo, o por la reacción con los ácidos fúlvicos y húmicos<sup>12,13</sup>. El metilmercurio se forma mayoritariamente en la naturaleza a través de procesos bióticos, principalmente por bacterias sulfatorreductoras, aunque en ambientes ricos en materia orgánica predomina la metilación abiótica bajo condiciones anaeróbicas<sup>14</sup>.

Sólo una pequeña fracción del mercurio depositado es metilado y atrapado en los océanos, mientras la mayoría es reducido a Hg<sup>0</sup> y vuelve a la atmósfera vía cambio gaseoso con la superficie del mar<sup>15</sup>. El Hg<sup>0</sup> evadido se oxidará en el aire y puede volver al mar a grandes distancias para repetir el ciclo.

El metilmercurio formado es fácilmente biodisponible y biomagnificable en la cadena alimenticia. Se acumula en los organismos acuáticos de acuerdo con el nivel trófico. Las mayores concentraciones se han encontrado en los tejidos de especies depredadoras como trucha de río, atún oceánico, lubina, pez espada y tiburón. El factor de bioconcentración (definido como la relación entre la concentración de metilmercurio en tejidos de peces y en agua) está normalmente entre 10.000 y 100.000. Además, la disponibilidad del mercurio para la biota acuática podría verse afectada por los niveles de selenio en agua<sup>9</sup>.

Los fungicidas alquilmercuriales usados para el tratamiento de semillas son importantes fuentes de mercurio en las cadenas alimenticias

terrestres. El mercurio pasa primero a los roedores y pájaros que comen el grano y consecuentemente a los pájaros carnívoros<sup>16</sup>.

La acumulación del metilmercurio en las cadenas alimenticias acuáticas y terrestres representa un peligro potencial para el hombre por consumo de ciertas especies de peces oceánicos, de peces o mariscos de aguas contaminadas y de la caza de pájaros en áreas donde se usan los fungicidas de metilmercurio.

Más del 85 % de la cantidad total de mercurio en la biota está en forma de metilmercurio<sup>17</sup>, mientras que en el agua raramente pasa del 10 % y en sedimentos este valor varía entre de 0,1 a 1,5 % del mercurio total<sup>18</sup> y en aire 0,3–1,0 %<sup>19</sup>. Así, en la biota el mercurio se encuentra principalmente como metilmercurio, mientras en el resto de las matrices se encuentra como Hg<sup>2+</sup> (sedimentos y suelos) o Hg<sup>0</sup> (aire).

#### I.2.1.4. BIODISPONIBILIDAD, TOXICIDAD Y CASOS DE CONTAMINACIÓN

La biodisponibilidad del mercurio, definida como la capacidad de un organismo para extraer mercurio de la matriz medioambiental, por las diferentes vías (pulmones, tracto gastrointestinal y dérmica) varía según la especie de mercurio como puede observarse en la tabla I.2.3.

Tabla I.2.3. Absorción de las especies de mercurio por vías<sup>16,20</sup>.

Vía	Hg Elemental	Hg Inorgánico	Hg Orgánico
Pulmones	80 %	Variable	100 %
Tracto Gastrointestinal	< 1 %	7 %	100 %
Dérmica	< 1 %	< 1 %	80 %

## EL MERCURIO

---

La exposición a mercurio elemental es casi exclusivamente a través de la inhalación del vapor. La población general ha tenido pocas exposiciones a mercurio elemental, y estas exposiciones se producen por usos deliberados. La exposición más alta es la ocupacional, normalmente en operaciones de minería pero sobre 50 ocupaciones específicas o tareas conllevan frecuentes exposiciones a mercurio vapor. También producen exposiciones a mercurio elemental el uso del mercurio en amalgamas dentales y algunas prácticas culturales, como la Santería.

Sobre la absorción a través de la piel se tiene poca información aunque se sospecha que mientras para mercurio elemental y sales inorgánicas es nula para especies orgánicas es moderadamente alta. El uso de jabones y cremas blanqueadores de piel está aumentando sustancialmente la exposición a mercurio por vía dérmica, principalmente en Norte América y África<sup>10</sup>.

La forma de exposición más importante a metilmercurio es a través de la dieta, principalmente por la ingesta de peces, crustáceos y derivados. Para peces comestibles la concentración de mercurio total no debe exceder  $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$  <sup>9,21</sup>, siendo un 85 % la media encontrada como metilmercurio<sup>14</sup>, excepto para los principales depredadores: rape, mero, bonito, fletán, lucio, raya, tiburón, esturión, pez espada, atún,..., en los que no debe exceder  $1 \text{ mg.kg}^{-1}$  de peso fresco<sup>21</sup>, y se recomienda limitar la frecuencia del consumo de estos peces depredadores en particular en mujeres embarazadas y niños de corta edad<sup>22</sup>.

La mayoría de las especies de mercurio se eliminan principalmente por la orina y las heces.



El mercurio y sus compuestos pueden causar efectos tóxicos reversibles e irreversibles, dependiendo de la dosis y la duración de la exposición.

Los síntomas clásicos de envenenamiento por vapores de mercurio son eretismo (irritabilidad, excitabilidad, pérdida de memoria, insomnio), temblores y gingivitis. La mayoría de los efectos del mercurio vapor son reversibles con el cese de la exposición, aunque la recuperación completa de los efectos psicológicos es difícil de determinar<sup>16</sup>.

El metilmercurio produce daños neurológicos irreversibles, en animales se ha observado un período latente de semanas o meses entre el cese de la exposición y el comienzo del envenenamiento, produciéndose cambios morfológicos en el cerebro antes del comienzo de los síntomas. Los fetos son más sensibles que los adultos<sup>16</sup>. Los síntomas más comunes de intoxicación por metilmercurio son parestesia, reducción del campo visual, defectos de oído, y ataxia. Los efectos son irreversibles pero puede producirse alguna mejora de la coordinación motora<sup>16</sup>.

En la bibliografía pueden encontrarse varios episodios de contaminación por exposición a las especies de mercurio, principalmente por la ingesta de alimentos con un elevado contenido de metilmercurio.

El primer caso de muerte por intoxicación con un compuesto organomercúrico tuvo lugar en 1863, cuando dos químicos intentaban determinar el número de oxidación del compuesto dimetilmercurio<sup>14</sup>.

El caso de contaminación más conocido ocurrió en la bahía de Minamata<sup>23</sup>, Japón, alrededor de 1960, en una industria de fertilizantes que

producía el metilmercurio como subproducto en la producción de acetaldehído, los residuos acababan en las aguas de la bahía y la población de Minamata se alimentaba de los peces provenientes de esa bahía. Oficialmente se reconoció que 2.252 personas fueron directamente intoxicadas por el metilmercurio, los muertos ascendieron a 1.043 y un total de 12.127 personas reivindicaron tener la dolencia.

En la década de los 70, en Irak, Pakistán, Gana y Guatemala tuvieron lugar varios episodios de contaminación de agricultores y sus familias, que utilizaban granos tratados con funguicidas a base de metil- y etilmercurio para elaborar el pan. En el caso particular de Irak más de 6.900 personas fueron hospitalizadas y unas 459 murieron. En 1969, en los Estados Unidos, se produjo una intoxicación por la ingestión de carne de cerdos alimentados con granos tratados con plaguicidas organomercuriales<sup>24</sup>.

En 1997, una investigadora de la universidad de Dartmouth (USA) murió intoxicada algunos meses después de que unas gotas de dimetilmercurio puro atravesaran sus guantes de látex<sup>25</sup>.

Actualmente en el Amazonas<sup>26</sup>, se ha reconocido un gran problema de contaminación de mercurio en peces que afecta principalmente a los indígenas cuya principal base de proteínas en la alimentación es el pescado. El mercurio se liberó durante las operaciones en minas de oro, pero los principales problemas de contaminación de mercurio son probablemente debidos a la deforestación y a la construcción de embalses en los ríos.

## I.2.2. ESPECIACIÓN DE MERCURIO

De acuerdo con la IUPAC, el análisis de especiación se define como “la actividad analítica de identificación y medida de una o más de las especies químicas individuales en una muestra”, mientras la especiación de un elemento se define como “la distribución de las especies químicas definidas de un elemento en un sistema”<sup>27</sup>. Por lo tanto, puede entenderse como especiación elemental el análisis que lleva a la determinación de la distribución de las especies químicas de un elemento particular en una muestra, nos da información de las formas químicas de un elemento y de la cantidad existente de cada una de ellas en una muestra. El interés en la especiación ha crecido en las últimas dos décadas como puede verse reflejado en el desarrollo de técnicas analíticas que discriminan entre las diferentes formas de un elemento<sup>5,28,29,30</sup>.

Debido a la toxicidad del mercurio orgánico, al hecho de que los compuestos de mercurio orgánico pueden formarse en la naturaleza y a la bioacumulación del metilmercurio es de gran interés intentar comprender la distribución del mercurio en la naturaleza y la interconversión entre los diferentes compuestos de mercurio, para lo que es necesaria la especiación de mercurio<sup>6,8,31,32,33,34</sup>.

Pero la determinación de las formas químicas de un elemento es todavía un desafío analítico. Las especies orgánicas frecuentemente son inestables y las concentraciones encontradas en las diferentes matrices de interés son de  $\mu\text{g.L}^{-1}$  o en algunos casos  $\text{ng.L}^{-1}$  (aguas) o  $\text{ng.g}^{-1}$  (sedimentos y tejidos biológicos), mientras las formas inorgánicas pueden

presentarse simultáneamente en concentraciones que difieren hasta en tres órdenes de magnitud.

El análisis de la mayoría de las muestras medioambientales requiere una secuencia de tres pasos: preparación de muestra, separación y detección. La preparación de muestra tiene que transferir las especies de la muestra a una disolución adecuada a la técnica de separación, normalmente una técnica cromatográfica, lo cual requiere varios pasos incluyendo:

- Filtración, para separar partículas de muestras gaseosas y acuosas;
- Extracción, separación de las especies de la matriz de la muestra o solubilización, no se elimina la matriz de la muestra;
- Preconcentración, para incrementar la concentración de las especies en disoluciones;
- Limpieza, eliminación de componentes de la matriz;
- Derivatización, conversión controlada de las especies presentes en la muestra en formas que mejoran la separación cromatográfica.

El muestreo y la preparación de muestra son áreas críticas para el desarrollo de estudios de especiación. En la etapa de almacenamiento a veces se introducen errores y, por lo tanto, los datos analíticos no contendrán información sobre las especies en las muestras originales.

El procedimiento de preparación de muestra va a venir condicionado por las bajas concentraciones de los analitos, del tipo de muestra que va a ser analizada, la estabilidad de los analitos y la necesidad de conservar la forma organometálica durante el procedimiento y los requerimientos de la

técnica de separación y determinación en términos de volumen de muestra, polaridad, y volatilidad.

Para la detección, se usan técnicas atómicas analíticas sensibles y selectivas, generalmente acopladas con cromatografía líquida o de gases. La especiación simultánea de varios elementos también constituye una importante tarea, aunque generalmente surgen problemas en la preparación de muestra debido a las diferentes condiciones necesarias para cada elemento.

#### **I.2.2.1. PREPARACIÓN DE MUESTRAS LÍQUIDAS**

En muestras líquidas, aparecen estudios en la bibliografía<sup>35</sup> de varios parámetros que podrían influir en la estabilidad del mercurio inorgánico y del metilmercurio durante el almacenamiento como pueden ser: la concentración de las especies<sup>13,36</sup> (mayor pérdida en disoluciones donde la concentración es mas baja), el material del recipiente<sup>13,37</sup> (se desaconseja el uso de recipientes de polietileno, polipropileno y cloruro de polivinilo, los mejores recipientes son teflón y pirex), la temperatura de almacenamiento<sup>36</sup>, el pH de la muestra<sup>36</sup> (se recomienda la acidificación de la muestra para evitar pérdidas por absorción en las paredes de los recipientes de almacenamiento) y la exposición a la luz<sup>36</sup> (parece no tener importancia).

La concentración total de mercurio en aguas naturales está entre 0,2 a 100 ng.L<sup>-1</sup> mientras el nivel de metilmercurio alcanza aproximadamente 10 ng.L<sup>-1</sup> <sup>38</sup>. El criterio de calidad de agua de la EPA para mercurio inorgánico

son  $0,77 \mu\text{g.L}^{-1}$  para agua dulce y  $0,94 \mu\text{g.L}^{-1}$  para agua salada. El nivel máximo de mercurio inorgánico permitido en agua de bebida es  $2 \mu\text{g.L}^{-1}$  <sup>39</sup>.

En la extracción, el objetivo es separar el analito de interés de la matriz de la muestra con un rendimiento y selectividad óptimos, de tal manera que sólo especies con pequeño potencial interferente pasen a través del paso de separación de la muestra.

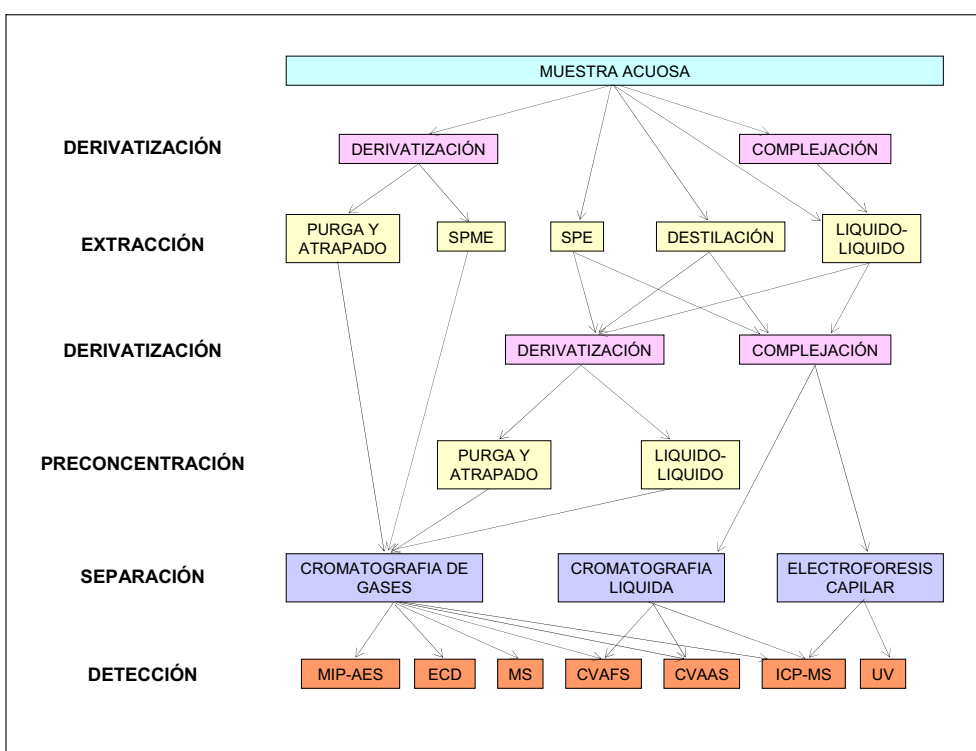


Figura 1.2.2. Técnicas de preparación de muestra para el análisis de especiación de mercurio en muestras acuosas.

En la figura 1.2.2 se recogen las técnicas de tratamiento de muestra, separación y detección utilizadas en muestras de agua. Las técnicas más usadas para la extracción de compuestos de mercurio de muestras acuosas son la extracción líquido-líquido con disolventes, la destilación, la extracción en fase sólida (SPE), la microextracción en fase sólida (SPME) y la purga y atrapado.

### **I.2.2.1.1. Extracción con Disolventes**

La extracción con disolventes es un método tradicional que consiste en obtener los analitos de la muestra por partición en un disolvente inmisible. Es necesario el uso de disolventes no miscibles con el agua, como tolueno<sup>40</sup>, hexano<sup>41</sup>, isooctano<sup>42</sup>, diclorometano<sup>43,44</sup> y benceno<sup>45,46,47</sup>.

Para mejorar la transferencia de los compuestos a la fase orgánica es necesario la formación de un complejo quelato extraíble o compuestos no polares en la disolución antes de su extracción. Los agentes más utilizados son iones haluro<sup>45,47</sup> (I<sup>-</sup>), tetra(alquil/-aril) boratos<sup>42,43,44</sup> (NaBPh<sub>4</sub>, NaBPr<sub>4</sub>, NaBEt<sub>4</sub>), aminas ternarias<sup>46</sup> y ditizona<sup>40</sup>.

Este método usa grandes volúmenes de disolventes orgánicos y grandes volúmenes de muestra, teniendo que repetirse la extracción 2–3 veces para alcanzar recuperaciones elevadas. Con algunas muestras, pueden producirse emulsiones lo que podría complicar y prolongar el paso de extracción. El proceso es lento, requiere una considerable mano de obra y genera un gran volumen de residuo de disolvente orgánico.

### **I.2.2.1.2. Destilación**

Se ha utilizado la destilación <sup>48,49,50,51</sup> con ácido sulfúrico y haluros de potasio para la separación de metilmercurio de las muestras de agua. La extracción se realiza a presión atmosférica y elevada temperatura (140–180°C) y, normalmente, seguido por la extracción en un disolvente orgánico (diclorometano) y derivatización de los analitos (NaBEt<sub>4</sub>). Con esta técnica se obtienen recuperaciones más altas y más reproducibles que con

otras técnicas de extracción como la extracción líquido-líquido, aunque es una técnica bastante lenta.

La adición de ditiocarbamato pirrolidín amónico<sup>49,50</sup> (APDC) puede mejorar la recuperación en agua de mar, disminuir el tiempo de extracción (hasta 8,5 min) y eliminar totalmente la co-destilación de mercurio inorgánico.

#### **I.2.2.1.3. Extracción Líquido-Gas (Purga y atrapado)**

La extracción líquido-gas consiste en burbujear la disolución acuosa con un gas inerte (nitrógeno o helio) para extraer las especies volátiles no polares en la fase gas, las especies necesitan ser convertidas previamente en hidruros<sup>52,53,54,55</sup> o derivados alquilados/arilados<sup>56,57,58,59,60,61,62</sup> volátiles (derivatización), las especies purgadas son atrapadas en una trampa criogénica<sup>52,54,56,60</sup> o en una trampa<sup>57,63</sup> de tenax o carbotrap y liberadas normalmente en la columna cromatográfica.

Bloom<sup>56</sup> desarrolló este método usando NaBEt<sub>4</sub> como derivatizante y el atrapado en trampa criogénica, este método ofrece altos factores de preconcentración y permite la introducción de muestras bastante limpias en la columna cromatográfica. Pueden aparecer algunas interferencias durante la etapa de derivatización en muestras de agua de mar debido a la gran concentración de iones cloruro.

#### **I.2.2.1.4. Extracción en Fase Sólida (SPE)**

En este método los analitos se extraen por atrapado en una fase inmovilizada, se eluyen con un volumen mínimo de disolvente. Las ventajas sobre la extracción líquido-líquido incluyen un factor de enriquecimiento



más alto, menor consumo de disolvente, menor riesgo de contaminación y resulta fácilmente automatizable. Las muestras tienen que estar filtradas previamente.

Se han utilizado diferentes fases: resinas con agentes quelatantes inmovilizados como ditiocarbamato<sup>64,65,66,67,68,69,70,71</sup>, ditiocarbazona<sup>71,72</sup>, ditizona<sup>73</sup>, 2-mercaptoetanol<sup>74</sup>, con grupos dadores de nitrógeno y azufre<sup>75</sup> (1,2-bis (o-aminofeniltio)etano) y columnas de algodón<sup>76,77,78,79</sup> con grupos funcionales -SH (SCF).

Las fases más utilizadas son las de ditiocarbamato y las de algodón con grupos sulfhidrilo. La separación de los compuestos de mercurio de los otros componentes de la muestra se lleva a cabo basándose en la gran afinidad del mercurio por los grupos dadores de azufre. En las resinas con grupos ditiocarbamato la elución de los compuestos de mercurio se consigue con una disolución de tiourea acidificada<sup>64,65,66,67,68,69,70</sup>, y en las de algodón con grupos sulfhidrilo con ácido clorhídrico<sup>76,77</sup>, mejorando la elución mediante la adición de sales de cobre y bromuro de potasio al eluyente<sup>78,79</sup>.

Las resinas modificadas con grupos dadores de nitrógeno y azufre<sup>75</sup> permite la elución selectiva, primero se realiza la elución del metilmercurio con etanol y después la elución del mercurio inorgánico con tiourea acidificada.

Fernández y col.<sup>71</sup> utilizan columnas C18 con diferentes modificadores: dietil ditio carbamato, pirrolidin-1-etil ditio formato, difenil

tiocarbazona y la elución se realiza con etanol, concluyendo que los mejores resultados se obtienen con las columnas con ditiocarbamatos.

Si se va a usar cromatografía de gases como técnica de separación, tras SPE en la mayoría de los casos se realiza un paso de derivatización/extracción<sup>66,67,69,77</sup>.

#### **I.2.2.1.5. Microextracción en Fase Sólida (SPME)**

Este método fue desarrollado por Arthur y Pawliszyn en 1990<sup>80</sup> para eliminar el último paso de la extracción en fase sólida que requería la elución normalmente usando un disolvente orgánico. Se usa una fibra revestida con una fase estacionaria como medio de extracción. Tras la extracción, la fibra puede colocarse en el inyector de un cromatógrafo de gases de manera que los analitos se desorben directamente en la corriente del gas portador. Las especies de mercurio son normalmente convertidas en derivados volátiles (derivatizadas) antes de someterse al proceso de extracción.

Esta técnica combina extracción, pre-concentración, introducción de la muestra y ofrece varias ventajas incluyendo la reducción del tiempo de extracción por muestra, menos manipulación de muestra, eliminación de disolventes orgánicos, simplicidad, bajo coste y posibilidad de determinación on-line.

La elección de la fase absorbente usada en el muestreo de SPME afectará directamente a la selectividad del análisis. Hay diferentes fibras disponibles comercialmente, clasificadas según su mecanismo de extracción en fibra absorbente y adsorbente. Las fibras absorbentes

extraen por partición del analito en un revestimiento líquido, de esta clase son PDMS (polidimetilsiloxano) y PA (poliacrilato). Las fibras adsorbentes extraen los analitos por interacciones físicas, en esta clase están PDMS/DVB (polidimetilsiloxano/divinilbenceno), CW/DVB (carbowax/divinilbenceno), CAR/PDMS (carboxen/polidimetilsiloxano) y DVB/CAR/PDMS (divinilbenceno/carboxen/polidimetilsiloxano).

Cai y Bayona<sup>81</sup> en 1995 fueron los primeros en aplicar esta técnica a especies de mercurio, obteniendo en 10 minutos de extracción, en espacio de cabeza, límites de detección muy bajos con una fibra de 100 µm de poli(dimetil)siloxano (PDMS) , tras la derivatización con NaBEt<sub>4</sub>. Este método ha sido muy utilizado y se ha aplicado también al análisis multielemental<sup>82,83,84</sup>.

Se han utilizado otros agentes derivatizantes<sup>85,86</sup> para intentar evitar los problemas de interferencias durante la derivatización con NaBEt<sub>4</sub> en muestras de agua salada debido a las elevadas concentraciones de iones cloruro.

Los experimentos realizados por Bravo-Sánchez y col.<sup>86</sup> en agua de mar usando calibración externa llevan a valores de Hg<sup>2+</sup> y MeHg<sup>+</sup> varias veces más bajos que las señales analíticas correspondientes al agua milli-Q. Este hecho hace evidente la existencia de efecto matriz en el proceso de derivatización en agua de mar. Para tratar este problema recurren a añadir EtHg<sup>+</sup> como patrón interno, pero el efecto matriz es tan fuerte que el uso de un patrón interno no lo puede corregir totalmente. Debido a este efecto matriz es necesario el uso de adiciones estándar o dilución isotópica.

He y col.<sup>87</sup> han sintetizado una fase en el laboratorio sumergiendo la fibra de sílice fundida en ácido fluorhídrico durante 3–4,5 h para obtener una fibra con gran eficiencia y selectividad.

Mester y col.<sup>88</sup> han realizado estudios mediante SPME sin previa derivatización, por lo que son necesarias fases más polares para la extracción de los analitos, como 65 µm de PDMS/DVB.

Recientemente, Centineo y col.<sup>89</sup> han desarrollado un método de SPME para el análisis multielemental usando una fibra DVB/CAR/PDMS, obteniendo una extracción mucho mayor que con la fibra de PDMS.

En la tabla I.2.4 aparece recogida la evolución de los métodos de especiación de mercurio en muestras acuosas.

Tabla I.2.4. Resumen de métodos de determinación de especies de mercurio en muestras acuosas.

Año	Preparación de la muestra	Separación/ Detección	Obs.	Ref.
1974	LLE: NaI + benceno	GC- MIP-AES	LOD: 1 ng.L <sup>-1</sup>	45
1976	LLE: Amina ternaria +benceno	GC-MIP-AES	LOD: 1- 2,5 ng.L <sup>-1</sup>	46
1980	SPE: DTC (Q-10) elución con tiourea acidificada	CVAAS	LOD: 0,2 ng.L <sup>-1</sup> (20 L)	64
1989	SPE: SCF elución con HCl + NaCl; Extracción en benceno	GC-ECD	LOD: 0,05 ng.L <sup>-1</sup> (4 L)	76
1989	Derivatización con NaBEt <sub>4</sub> ; Purga y atrapado en Trampa criogénica	GC-CVAFS	LOD: 0,003 ng.L <sup>-1</sup> (200 mL)	56
1990	SPE: DTC (Q-10) elución con tiourea acidificada; Derivatización con AcI	HS-GC-MIP-AES	LOD ng.L <sup>-1</sup>	65
1992	LLE: NaI + benceno	GC-ICP-AES	LOD: 1,5 pg	47

Tabla I.2.4. Resumen de métodos de determinación de especies de mercurio en muestras acuosas.

Año	Preparación de la muestra	Separación/ Detección	Obs.	Ref.
1993	Destilación: H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /KCl; Extracción con DCM; Reextracción en agua por volat.; Derivatización con NaBEt <sub>4</sub> ; Purga y atrapado en una Trampa Carbotrap	GC-CVAFS	LOD: 0,006 ng.L <sup>-1</sup> (50 mL)	48
1993	SPE: DTC elución con tiourea acidificada; Extracción en tolueno; Derivatización con Reactivo de Grignard	GC-MIP-AES	LOD: 0,05 ng.L <sup>-1</sup> MeHg, EtHg; 0,15 ng.L <sup>-1</sup> Hg (500 mL)	66
1993	SPE: columna C18 como complejos de cisteína	HPLC-CVAAS	LOD: 10 ng.L <sup>-1</sup> Hg; 200 ng.L <sup>-1</sup> MeHg; 60 ng.L <sup>-1</sup> EtHg (100 mL)	90
1994	SPE: cartuchos sep-pack C18 modificados con 2-mercaptoetanol	HPLC-CVAAS	LOD: 0,1-0,2 µg.L <sup>-1</sup>	74
1994	Derivatización con NaBH <sub>4</sub> ; Purga y atrapado en Trampa criogénica	GC-pirolisis-AFS	LOD: 0,1-1 ng.L <sup>-1</sup>	52
1994	Derivatización con NaBEt <sub>4</sub> ; Purga y atrapado en Trampa Carbotrap o Tenax	GC-CVAFS	LOD: 0,004 ng.L <sup>-1</sup> MeHg; 0,009 ng.L <sup>-1</sup> Hg <sup>2+</sup> (150 mL)	57
1995	SPE: SPDC elución con tiourea acidificada	HPLC-UV-PCO-CVAAS	LOD: 0,5 ng.L <sup>-1</sup>	91
1995	Derivatización con NaBEt <sub>4</sub> ; SPME: fibra PDMS, HS 10 min 25°C; directa 20 min 25°C	GC-(EI)-MS	LOD: HS 7,5 ng.L <sup>-1</sup> MeHg; 3,5 ng.L <sup>-1</sup> Hg; Directa; 6,7 ng.L <sup>-1</sup> MeHg; 8,7 ng.L <sup>-1</sup> Hg	81
1995	SPE: SCF elución con HCl; Derivatización con NaBPh <sub>4</sub> ; Extracción en n-hexano	GC-MIP-AES	LOD: 10 ng.L <sup>-1</sup> MeHg EtHg; 16 ng.L <sup>-1</sup> Hg (200 mL)	77
1995	SPE: DTC elución con tiourea acidificada; Extracción en tolueno; Derivatización con Reactivos de Grignard	GC-MIP-AES	LOD: 0,5 ng.L <sup>-1</sup> MeHg; 0,6 ng.L <sup>-1</sup> EtHg; 0,5 ng.L <sup>-1</sup> Hg (100 mL) Especiación de Hg y Pb	67
1996	SPE: DTC elución con tiourea acidificada	HPLC-ICP-MS	LOD 16 ng.L <sup>-1</sup> MeHg; 17 ng.L <sup>-1</sup> Hg (1 L)	68
1996	SPE: SCF elución con mezcla ácida de KBr, CuSO <sub>4</sub> ; Extracción en DCM	GC-pirolisis-AFS	LOD: 0,01 ng.L <sup>-1</sup> MeHg, EtHg (1L)	78

Tabla I.2.4. Resumen de métodos de determinación de especies de mercurio en muestras acuosas.

Año	Preparación de la muestra	Separación/ Detección	Obs.	Ref.
1996	SPE: DTC elución con tiourea acidificada; Extracción en hexano; Derivatización con Reactivo de Grignard	GC- MIP-AES	LOD: 0,008 ng.L <sup>-1</sup>	69
1996	Derivatización con NaBEt <sub>4</sub> ; Purga y atrapado en Trampa criogénica	GC-MIP-AES	LOD: 0,60 ng.L <sup>-1</sup> MeHg ; 2 ng.L <sup>-1</sup> Hg (10 mL)  Detección simultanea de Sn, Pb y Hg	58
1997	LLE: Extracción en DCM /Derivatización con NaBPh <sub>4</sub>	GC-MS	LOD: 1 ng.L <sup>-1</sup> MeHg (100 mL)	43
1997	Derivatización con NaBEt <sub>4</sub> ; SPME: HS-PDMS 10 min	GC-ICP-MS	LOD: 4,3 ng.L <sup>-1</sup>  Determinación simultanea de Hg, Pb y Sn.	82
1997	Destilación: H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /KCl y APDC; Derivatización con NaBEt <sub>4</sub> ; Extracción en DCM	GC-CVAFS		49
1998	Destilación a vacío: H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /KCl y APDC; Derivatización con NaBEt <sub>4</sub> ; Extracción en DCM	GC-CVAFS	LOD: 0,024 ng.L <sup>-1</sup> (50 mL) en 8,5 min	50
1998	Derivatización con NaBEt <sub>4</sub> ; SPME: HS PDMS	GC-CVAFS	LOD: 3,0 ng.L <sup>-1</sup> (8,4 mL)	92
1998	Derivatización con KBH <sub>4</sub> ; SPME: HS fibra en HF pH 3, 90 min	GC-CVAAS	LOD: 26 ng (10 mL)	87
1998	Derivatización con APDC	HPLC- CVAAS	LOD: 5-10 ng.L <sup>-1</sup>	93
1998	Derivatización con NaBH <sub>4</sub> ; Purga y atrapado con Trampa criogénica	GC-GFAAS	LOD: 0,1 ng.L <sup>-1</sup>	53
1998	Derivatización con Ácido nitrilotriacético	EC-UV	Determinación simultanea de Pb, Hg, Se	94
1998	LLE: Extracción en isooctano; Derivatización con NaBPr <sub>4</sub>	GC-ICP-MS	LOD: 210 ng.L <sup>-1</sup>  Determinación simultanea de Pb, Hg, Sn	42
1999	Destilación a vapor; Derivatización con NaBEt <sub>4</sub> ; Extracción con DCM	GC-AFS GC-ICP-MS		51

Tabla I.2.4. Resumen de métodos de determinación de especies de mercurio en muestras acuosas.

Año	Preparación de la muestra	Separación/ Detección	Obs.	Ref.
1999	LLE: DDTc + hexano; Derivatización con Reactivos de Grignard	GC-MIP-AES		41
1999	Derivatización con NaBEt <sub>4</sub> ; SPME: HS PDMS 10 min, 22°C	GC-MS-MS	LOD: 7-22 ng.L <sup>-1</sup> (10 mL) Determinación simultanea de Hg, Pb y Sn	83
1999	Derivatización con NaBEt <sub>4</sub> ; SPME: PDMS 10 min	GC-ICP-MS	LOD: 0,13-3,7 ng.L <sup>-1</sup> (25mL) Determinación simultanea de Sn, Hg y Pb	84
1999	Derivatización con NaBEt <sub>4</sub> o NaBH <sub>4</sub> ; Purga y atrapado en trampa Chromosorb	GC-MIP-AES	LOD: 0,8 ng.L <sup>-1</sup> (MeHg) Determinación simultanea Hg, Sn, Pb	63
2000	SPE: DTC elución con tiourea acidificada	HPLC-ICP-MS	LOD: 5,2 ng.L <sup>-1</sup> Hg; 5,6 ng.L <sup>-1</sup> MeHg	70
2000	Derivatización con NaBPh <sub>4</sub> ; Purga y atrapado	GC-AFS GC-MIP-AES GC-MS	LOD: AFS y AES 0,02-0,04 pg; MS 30-50 pg	59
2000	SPME: PDMS/DVB 10 min 50°C	ICP-MS	LOD: 0,2 ng.mL <sup>-1</sup> MeHg (30 mL)	88
2001	Derivatización con NaBPr <sub>4</sub> ; Purga y atrapado en Trampa criogénica	GC-ICP-MS	LOD: 0,03 ng.L <sup>-1</sup> (50 mL)	60
2002	Derivatización con NaBH <sub>4</sub> ; Purga y atrapado en Trampa criogénica	GC-AFS		54
2002	LLE: Ditizona + tolueno; Extracción en Na <sub>2</sub> S, eliminación del H <sub>2</sub> S; Derivatización con NaBEt <sub>4</sub> Purga y atrapado en Tenax	GC-pirolisis-CVAFS	LOD: 0,006 ng.L <sup>-1</sup> MeHg; 0,06 ng.L <sup>-1</sup> Hg (300 mL)	40
2002	Derivatización con NaBPh <sub>4</sub> ; SPME: HS PDMS 70°C 27min	GC-MIP-AES	LOD: 95 ng.L <sup>-1</sup> MeHg; 330 ng.L <sup>-1</sup> Hg (40 mL)	85
2002	Derivatización con NaBEt <sub>4</sub> ; Purga y atrapado	GC-ICP-TOF-MS	LOD: 2 pg.L <sup>-1</sup> MeHg y 150 pg.L <sup>-1</sup> Hg	61
2002	Derivatización con NaBEt <sub>4</sub> ; Purga y atrapado	GC multicap-MIP-AES		62

Tabla I.2.4. Resumen de métodos de determinación de especies de mercurio en muestras acuosas.

Año	Preparación de la muestra	Separación/ Detección	Obs.	Ref.
2003	SPE: 1,2-bis (o-aminofenil)etano elución con etanol (MeHg) y tiourea con HCl (Hg)	CVAAS	LOD: 90 ng.L <sup>-1</sup> (50 mL)	75
2003	LLE: Extracción en DCM; Derivatización con NaBEt <sub>4</sub> ; Extracción en agua por evaporación	HS-GC-AFS	LOD: 0,01 ng.L <sup>-1</sup> (200 mL)	44
2003	Derivatización con NaBH <sub>4</sub> ; Purga y atrapado en Au paredes en la cámara de grafito	GF-ETV-MIP-OAS	Determinación simultánea de As, Bi, Ge, Sb, Se, Hg	55
2004	SPE: SCF elución con mezcla ácida de KBr, CuSO <sub>4</sub> ; Extracción DCM	GC-pirolisis-AFS	LOD: 0,01 ng.L <sup>-1</sup>	79
2004	Derivatización con NaBPr <sub>4</sub> ; SPME: PDMS 5min 25°C	GC-ICP-MS	LOD: 0,17 ng.L <sup>-1</sup> MeHg y 0,35 ng.L <sup>-1</sup> Hg (3 mL)	86
2004	Derivatización con NaBEt <sub>4</sub> ; SPME: HS DVB/CAR/PDMS 30 min 20°C	GC-MS	LOD : 3,1 ng.L <sup>-1</sup> MeHg; 2,3 ng.L <sup>-1</sup> Hg (5 mL) Determinación multielemental Hg, Sn, Hg.	89

### I.2.2.2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS SÓLIDAS

Las muestras sólidas de interés para el análisis de especiación puede dividirse en dos categorías: muestras de sedimentos y suelos y materiales biológicos.

Los sedimentos son capas de partículas minerales y orgánicas que se encuentran en el fondo de los reservorios de aguas naturales. Normalmente, en los sedimentos el metilmercurio sólo representa entre el 0,1–2 % del mercurio total. Los compuestos organometálicos aparentemente no están incluidos en procesos mineralógicos en



sedimentos y suelos, por lo tanto, la disolución completa de la muestra antes del análisis no se considera necesaria.

Por el contrario, en los materiales biológicos el metilmercurio representa entre el 80–90 % del mercurio total. Los compuestos organometálicos podrían ser incorporados en los tejidos de los organismos vivos, por lo tanto sería necesaria la disolución completa de la muestra.

En las muestras sólidas se pueden considerar diferentes métodos para el almacenamiento<sup>38</sup>: húmedo a temperatura ambiente, húmedo a bajas temperaturas, congelado, liofilizado, secado en el horno, secado en horno microondas y secado al aire a temperatura ambiente. La principal fuente de inestabilidad para el metilmercurio es debida a las bacterias por demetilación o formación de dimetilmercurio.

En la figura 1.2.3 se recogen las técnicas de tratamiento de muestra, separación y detección en muestras sólidas, las más usadas para la extracción de compuestos de mercurio son la lixiviación ácida, la hidrólisis alcalina, la destilación, la extracción asistida por ultrasonidos, la extracción asistida por microondas (MAE) y la extracción con fluidos supercríticos (SFE).

La lixiviación ácida, hidrólisis alcalina y la destilación son métodos analíticos no sólo laboriosos y lentos sino que también presentan insuficiente eficiencia. La lixiviación con HCl a temperatura ambiente no libera cuantitativamente los compuestos de metilmercurio de sedimentos, y la digestión alcalina con 25% KOH en metanol y la destilación libera cuantitativamente metilmercurio de sedimentos pero lleva entre 1 y 6

horas<sup>95,96</sup>. Por lo tanto, se ha pasado al uso de técnicas de extracción más rápidas, con menos consumo de disolventes y con mayor eficacia como son la extracción asistida por ultrasonidos, la extracción asistida por microondas y la extracción con fluidos supercríticos.

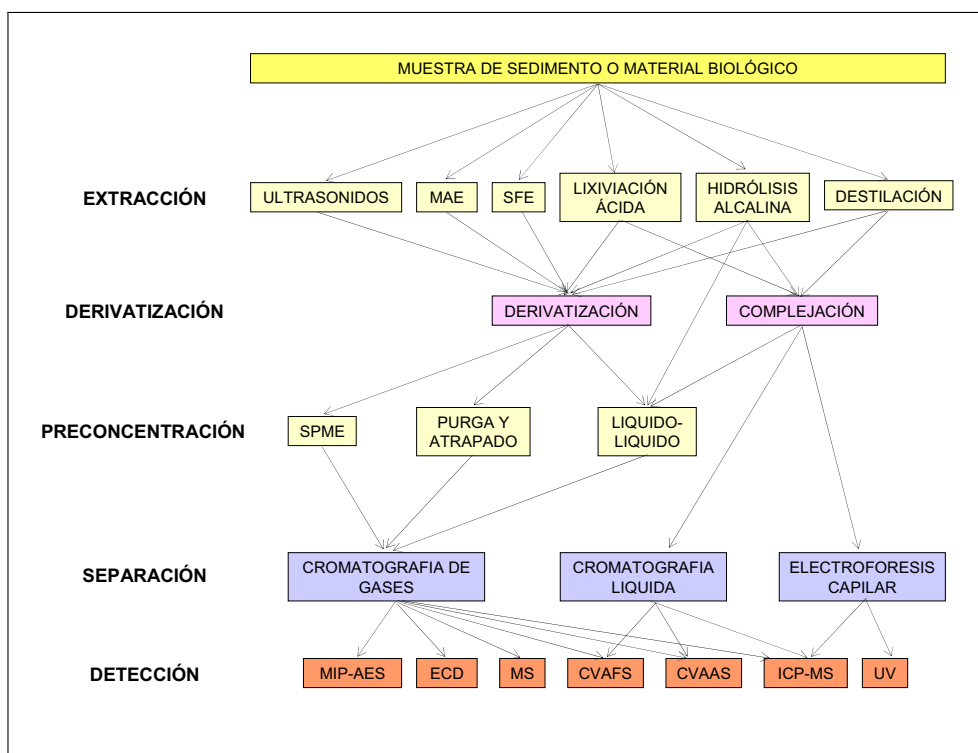


Figura I.2.3. Técnicas de preparación de muestra para el análisis de especiación de mercurio en muestras sólidas.

### **I.2.2.2.1. Lixiviación Ácida**

La lixiviación ácida consiste en el tratamiento de la muestra con un ácido seguido normalmente de la extracción en un disolvente orgánico. Principalmente este método se ha utilizado en la extracción de metilmercurio en peces y crustáceos, basándose en protocolos derivados de la técnica clásica de Westöö<sup>97,98</sup> que consiste en la extracción selectiva en benceno conteniendo HCl, seguido de la formación de un complejo de

cisteína, éste se extrae en agua y el metilmercurio se libera de nuevo por acidificación y es reextraído en benceno.

Algunas modificaciones de este método en la extracción de metilmercurio sustituyen el benceno por tolueno<sup>99,100,101</sup> o por tolueno con un agente complejante como dietilditiocarbamato (DDTC)<sup>102,103,104</sup>, o la disolución de cisteína por una disolución de tiosulfato sódico<sup>101,105</sup> o por un papel impregnado de cisteína<sup>100</sup>. Para evitar problemas por interferencias del mercurio inorgánico éste se elimina por lavado de la muestra con acetona previamente a la extracción<sup>106,107,108,109,110</sup>.

Este método también se ha aplicado a la extracción de metilmercurio de sedimentos<sup>106</sup> y se ha conseguido una mayor eficacia realizando la lixiviación ácida en presencia de bromuro potásico e iones cobre (II)<sup>111,112</sup>.

Decadt y col.<sup>113</sup> desarrollaron la extracción de los compuestos de mercurio mediante el tratamiento de la muestra con ácido iodoacético y tiosulfato, este método fue posteriormente modificado por Lansens y Baeyens<sup>114</sup> adicionando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Este método permite la extracción y la formación de un compuesto volátil en un solo paso.

#### **I.2.2.2.2. Hidrólisis Alcalina**

La hidrólisis alcalina consiste en el tratamiento de la muestra con una base seguido del ajuste de pH, se usa normalmente en muestras biológicas. La hidrólisis básica se realiza con reactivos como hidróxido de tetrametilamonio (TMAH)<sup>115</sup> o KOH metanólico<sup>116</sup> NaOH<sup>117</sup>, en muchos casos seguida de la extracción en un disolvente orgánico<sup>118,119</sup>.

El método desarrollado por Bloom<sup>116</sup> basado en la digestión alcalina con hidróxido potásico metanólico durante 2 o 3 horas a 75°C ha sido muy usado como base para el desarrollo de numerosos métodos<sup>92,118,119,120</sup>. Y también se ha aplicado a muestras de sedimentos<sup>118</sup>.

Filippelli<sup>121</sup> compara los resultados obtenidos mediante la lixiviación ácida en tolueno y la hidrólisis alcalina con KOH metanólico, obteniendo resultados similares, pero en el caso de la lixiviación ácida es necesario un paso de limpieza que consiste en la extracción de los analitos de interés en una disolución de tiosulfato sódico.

Harms<sup>117</sup> compara la lixiviación ácida en tolueno con la hidrólisis alcalina con NaOH en presencia de cisteína, obteniendo mejores resultados con NaOH.

#### **1.2.2.3. Destilación**

En este método la muestra de sedimento, suelo o material biológico se suspende en una disolución ácida, y la mezcla se destila a temperaturas elevadas (140–180°C) con nitrógeno<sup>95</sup> o a temperatura más baja (40°C) a elevada presión<sup>122</sup>.

La destilación se realiza normalmente con ácido sulfúrico<sup>95,123,124,125,126,127</sup>, cloruro potásico o sódico y sales de cobre, los iones cloruro forman los compuestos de mercurio clorados volátiles y las sales de cobre mejoran la eficacia de liberación de los compuestos organomercurícos de su unión a los grupos sulfhidrilo.

#### **I.2.2.2.4. Extracción Asistida por Ultrasonidos (USE)**

La extracción con ultrasonidos es una técnica sencilla y barata, bastante adecuada para el tratamiento de tejidos biológicos y sedimentos. Se usa el baño de ultrasonidos para minimizar las desventajas de los procedimientos convencionales de extracción en términos de tiempo, eficacia de extracción y gasto de disolvente, tanto de lixiviación ácida con HCl<sup>128,129,130</sup> o ácido acético<sup>84</sup> o de digestión alcalina con KOH metanólico<sup>81,131,132</sup> o TMAH<sup>133,134</sup>.

Fisher y col.<sup>132</sup> utilizan un baño de ultrasonidos para minimizar el tiempo de extracción del método propuesto por Bloom<sup>116</sup> que extrae el metilmercurio de tejidos biológicos mediante el tratamiento con KOH metanólico. Este método se ha utilizado tanto en material biológico<sup>81,135,136</sup> como en sedimentos<sup>131</sup>.

Caricchia y col.<sup>131</sup> comparan la extracción de especies de mercurio de sedimentos en baño de ultrasonidos con diferentes ácidos y bases como KOH metanólico, NaOH/NaCl, HCl y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/CuSO<sub>4</sub>/KBr, obteniendo los mejores resultados con hidróxido potásico.

Cabañero y col.<sup>129</sup> eligen la extracción con HCl en baño de ultrasonidos para la extracción de material biológico tras su comparación con otros extractantes como TMAH, KOH metanólico y dodecilsulfato sódico (SDS).

#### **I.2.2.2.5. Extracción Asistida por Microondas (MAE)**

La extracción asistida por microondas se ha usado para la extracción de especies de mercurio de material biológico, suelos y sedimentos,

acelerando la extracción tanto con ácidos, bases o con disolventes orgánicos.

Los parámetros esenciales a optimizar son el medio de extracción, la energía aplicada y el tiempo de exposición. MAE es considerablemente más rápida que otras técnicas de extracción y preparación de muestra, un tratamiento de muestra puede realizarse sólo en 2 o 3 minutos<sup>137,138</sup>.

MAE se ha utilizado principalmente en sedimentos con ácido nítrico<sup>44,53,137,139,140</sup>, obteniendo la extracción en 3 min con una potencia de 60W y en material biológico con hidróxido de tetrametilamonio (TMAH)<sup>53,138,141,142,143,144,145,146,147,148</sup> en 2–3 min a 40–60W.

Vázquez y col. desarrollaron la extracción con tolueno en presencia de ácido clorhídrico durante 10 min a 100–120°C tanto en sedimentos<sup>149</sup> como en material biológico<sup>150</sup>.

Tseng y col. han estudiado diferentes medios de extracción en diferentes matrices. En sedimentos<sup>137</sup> han probado ácido acético, ácido clorhídrico, ácido nítrico y ácido sulfúrico, obteniendo bajas recuperaciones con HAc y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Y en material biológico<sup>138</sup> los reactivos evaluados han sido ácido acético, ácido clorhídrico, ácido nítrico, TMAH y KOH. HAc produce bajas recuperaciones y HCl y HNO<sub>3</sub> producen la descomposición del metilmercurio, obteniendo los mejores resultados con medios básicos.

Rio Segade y Tyson<sup>151</sup> comparan la eficacia de extracción e interferencias de matriz en la determinación de mercurio en muestras biológicas y sedimentos mediante extracción convencional (3 horas) y asistida por microondas (60 W, 3 min) en medio alcalino (25% hidróxido de

tetrametilamonio- TMAH) o ácido (HCl 6 mol.L<sup>-1</sup>). HCl proporciona buenos resultados tanto en sedimentos como en material biológico, mientras TMAH sólo proporciona buenos resultados para muestras de material biológico. La extracción asistida por microondas produce una recuperación igual o mejor que con métodos convencionales, menores interferencias de matriz y el tiempo se reduce de 3 horas a 3 minutos.

#### **I.2.2.2.6. Extracción con Fluidos Supercríticos (SFE)**

El uso de fluidos supercríticos es un procedimiento adecuado para la preparación de muestra debido a la reducción del consumo de disolventes orgánicos. El CO<sub>2</sub> es el fluido supercrítico más adecuado y usado en las extracciones, ya que no es tóxico ni inflamable y presenta un gran poder disolvente. Se ha utilizado para la extracción de especies de mercurio de muestras de sedimentos<sup>152</sup> y de material biológico<sup>153,154</sup>.

Sun y col.<sup>155</sup> estudiaron la posibilidad de la extracción/bencilación con NaBPh<sub>4</sub> en un solo paso con patrones depositados sobre papel de filtro.

Wai y col.<sup>156</sup> estudiaron la aplicabilidad de SFE a la extracción de especies de mercurio de muestras sólidas utilizando metanol como modificador y bis(trifluoroetil)ditiocarbamato de litio (LiFDDC) como agente quelatante. Este método se ha aplicado recientemente a muestras reales de sedimentos y suelos<sup>157</sup>.

Dada la extensa bibliografía sobre la especiación de mercurio en sedimentos se han recogido en la tabla I.2.5.

Tabla I.2.5. Resumen de métodos de determinación de especies de mercurio en muestras de sedimentos.

Año	Preparación de muestra	Separación/ Detección	Obs.	Ref.
1993	Destilación KCl/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; Derivatización con NaBEt <sub>4</sub> ; Purga y atrapado en Trampa Carbotrap	GC-CVAFS	LOD: 0,001 ng.g <sup>-1</sup>	95
1994	Extracción de la muestra acidificada con KBr y Cu <sup>2+</sup> en DCM; Extracción en tiosulfato y Reextracción en DCM	GC- pirólisis-AFS		111
1994	Extracción de la muestra acidificada con benceno; Extracción con cisteína y Reextracción con benceno	GC-MIP-AES		106
1994	Extracción de la muestra acidificada con tolueno; Extracción con cisterna y Reextracción con tolueno	GC-ECD	LOD: 5 ng.mL <sup>-1</sup>	158
1995	Destilación ácida con nitrógeno; Derivatización con NaBEt <sub>4</sub> ; Purga y atrapado en tenax	GC-ICP-MS	LOD: 0,02 ng.g <sup>-1</sup>	123
1995	Extracción con NaOH metanólica; Derivatización con NaBEt <sub>4</sub> / Extracción en n-pentano	GC-MIP-PED		159
1996	SFE: trampa ODS, elución con tolueno; Derivatización con Reactivo de Grignard	GC-MIP-AES	LOD: 0,1 ng.g <sup>-1</sup> (1 g)	152
1996	Extracción con KOH metanólico 75°C 3 h; Extracción con DCM y Reextracción en agua; Derivatización con NaBEt <sub>4</sub> ; Purga y Atrapado	GC-CVAFS	LOD: 0,02 ng.g <sup>-1</sup> (0,5 g)	118
1997	MAE: HCl 6M + Tolueno; 120°C 10 min	GC-ECD	LOD: 8 ng.g <sup>-1</sup> (1,5 g)	149
1997	Extracción con KOH/metanol en ultrasonidos 45 min; Extracción en tolueno con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , CuSO <sub>4</sub> , KBr; Extracción en cisteína y Reextracción en benceno con CuSO <sub>4</sub> y KBr	GC-ECD	LOD: 0,5 ng.g <sup>-1</sup> (2 g)	131
1997	Destilación ácida (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> y NaCl) con nitrógeno a elevada temperatura 140°C 45 min; Complejación con SPDC	HPLC-UV- PCO - CVAAS	LOD: 0,04 ng.g <sup>-1</sup> (1 g)	124



Tabla I.2.5. Resumen de métodos de determinación de especies de mercurio en muestras de sedimentos.

Año	Preparación de muestra	Separación/ Detección	Obs.	Ref.
1997	Destilación ácida (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> y KCl) con nitrógeno a elevada temperatura 180°C 45 min; Complejación con SPDC	HPLC- HPF/HHPN- ICP-MS	LOD: 0,025 ng.g <sup>-1</sup> (0,5 g)	160
1997	Destilación ácida (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> y KCl) con nitrógeno a elevada temperatura 180°C 45 min; Complejación con SPDC	HPLC-UV- PCO-CVAFS	LOD: 0,015 ng.g <sup>-1</sup> (0,5 g)	161
1997	MAE: HNO <sub>3</sub> 2M 60W 3 min; Derivatización con NaBEt <sub>4</sub> ; Purga y atrapado criogénico	GC-QFAAS	LOD: 0,5 ng.g <sup>-1</sup> (1 g)	137
1997	Destilación ácida (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , NaCl y CuCl <sub>2</sub> ) a vacío a 40°C; Extracción en tolueno y Reextracción en tiosulfato	CVAFS	LOD: 0,2 ng.g <sup>-1</sup>	122
1998	Destilación ácida (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> y NaCl) 150°C 30 min; Complejación con SPDC	HPLC-ICP- MS	LOD: 0,015 ng.g <sup>-1</sup>	162
1998	Sonicación con tiourea durante 50 minutos; Derivatización con NaBPh <sub>4</sub> ; Extracción en tolueno	GC-MS		163
1998	MAE: HNO <sub>3</sub> 60 W 3 min; Derivatización con NaBEt <sub>4</sub> ; Purga y atrapado criogénico	GC-GFAAS	LOD: 0,5 ng.g <sup>-1</sup>	53
1998	Destilación ácida (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> y KCl) 140°C 90min; Derivatización con NaBEt <sub>4</sub> ; Purga y atrapado en Tenax	GC-ICP-MS		125
1998	MAE: HNO <sub>3</sub> 60 W 3 min; Derivatización con NaBEt <sub>4</sub> ; Extracción en hexano	GC multicap- MIP-AES	Determinación simultanea de Pb, Hg, Sn	139
1999	Extracción ácida (ácido acético) en MeOH ultrasonidos 0,5-1h; Derivatización con NaBEt <sub>4</sub> ; SPME: PDMS, 10 min	GC-ICP-MS	LOD: 0,18 ng.g <sup>-1</sup> (0,5 g)  Determinación simultanea de Sn, Hg y Pb	84

## EL MERCURIO

Tabla I.2.5. Resumen de métodos de determinación de especies de mercurio en muestras de sedimentos.

Año	Preparación de muestra	Separación/ Detección	Obs.	Ref.
2000	Destilación ácida (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /KCl/Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ); Derivatización con NaBEt <sub>4</sub>	GC-AFS	LOD: 0,01 ng.g <sup>-1</sup> (1 g)	126
2000	Extracción ácida (CuSO <sub>4</sub> , KBr y H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) en tolueno; Derivatización con reactivo de Grignard; Purga y atrapado en Tenax	GC-MIP-AES	LOD: 0,1 ng.g <sup>-1</sup>	112
2001	MAE: KOH metanolico 2 min 84W; Extracción en DCM; Reextracción en agua	HPLC-UV- PCO-CVAFS	LOD: 12 ng.g <sup>-1</sup>	164
2001	Destilación ácida (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /KBr/CuSO <sub>4</sub> ); Derivatización con NaBEt <sub>4</sub> ; Purga y atrapado en Tenax	GC-ICP-MS	LOD: 0,3 ng.g <sup>-1</sup>	127
2002	Ablación láser (LA)	ICP-MS	LOD: 20 ng.g <sup>-1</sup>	165
2003	MAE: HNO <sub>3</sub> 4M 10 min al 10% (20W); Extracción en DCM; Reextracción en agua; Derivatización con NaBEt <sub>4</sub>	HS-GC-AFS	LOD: 0,002 ng.g <sup>-1</sup>	44
2003	MAE: HNO <sub>3</sub> 60 W 3 min; Derivatización con NaBEt <sub>4</sub>	GC-ICP-MS		140

En la tabla I.2.6 aparece recogida la evolución de los métodos de especiación de mercurio en material biológico.

Tabla I.2.6. Resumen de métodos de determinación de especies de mercurio en muestras de material biológico.

Año	Preparación de muestra	Separación/ Detección	Obs.	Ref.
1966	Extracción tras acidificación con benceno; Extracción en hidróxido amónico saturado con sulfato amónico; Reextracción en benceno	GC-ECD	LOD: 50 ng.g <sup>-1</sup> (10 g)	97
1967	Extracción tras acidificación en benceno; Extracción en disolución de cisteína; Reextracción en benceno	GC-ECD		98

Tabla I.2.6. Resumen de métodos de determinación de especies de mercurio en muestras de material biológico.

Año	Preparación de muestra	Separación/ Detección	Obs.	Ref.
1971	Extracción tras acidificación en benceno; Extracción en disolución de cisteína; Reextracción en benceno	GC-MIP-AES	LOD: 50 ng.g <sup>-1</sup>	166
1973	Destilación con hexacianoferrato potásico con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 75°C 14h; Extracción en papel de cisteína, elución con HCl; Reextracción en benceno	GC-ECD	LOD: 1000 ng.g <sup>-1</sup> (1 g)	167
1973	Derivatización con NaI y Extracción en benceno	GC-ECD		168
1974	Extracción tras acidificación en benceno	GC-MIP-AES	LOD: 1 ng.g <sup>-1</sup>	45
1976	Lavado con acetona; Extracción tras acidificación en benceno	GC-ECD	LOD: 100 ng.g <sup>-1</sup>	107
1978	Extracción tras acidificación (NaCl + HCl) en tolueno; Extracción en disolución de cisteína	CVAAS	LOD: 1-2 ng.g <sup>-1</sup> (10 g)	99
1981	Tratamiento básico KOH + NaCl	CVAAS		169
1982	Columna de tierra de diatomeas con HCl; elución con CHCl <sub>3</sub> ; Extracción con Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	HPLC-CVAAS	LOD: 0,37 ng.g <sup>-1</sup>	170
1983	Lavado con acetona; Extracción tras acidificación en benceno	GC-ECD	LOD: 50 ng.g <sup>-1</sup> (2 g)	108
1985	Tratamiento con ácido iodoacético y tiosulfato	HS-GC-MIP-AES	LOD: 1,5 ng.mL <sup>-1</sup>	113
1987	Extracción de la muestra acidificada (HCl/NaCl) con benceno; Extracción en tiosulfato; Reextracción en benceno	GFAAS		105
1987	Lavado con acetona; Extracción de la muestra acidificada con Tolueno	GC-ECD	LOD: 250 ng.g <sup>-1</sup>	109
1990	Extracción de la muestra acidificada con Tolueno; Extracción en papel de cisteína, elución con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; Reextracción en benceno	GC-ECD	LOD: 0,1 ng.g <sup>-1</sup>	100

Tabla I.2.6. Resumen de métodos de determinación de especies de mercurio en muestras de material biológico.

<b>Año</b>	<b>Preparación de muestra</b>	<b>Separación/ Detección</b>	<b>Obs.</b>	<b>Ref.</b>
1990	Tratamiento con ácido iodoacético y H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	HS-GC- MIP-AES	LOD: 20 ng.g <sup>-1</sup>	114
1991	Extracción de la muestra acidificada con Tolueno; Extracción en tiosulfato; Derivatización con NaBEt <sub>4</sub>	GC-GFAAS		101
1991	Extracción de la muestra acidificada (NaCl y HCl) con tolueno complejoado con dietilditiocarbamato; Derivatización con reactivo de Grignard	GC-ECD		102
1992	Extracción de la muestra acidificada en tolueno; Extracción en tiosulfato; Derivatización con NaBH <sub>4</sub> ; Purga y atrapado	GC-FTIR		171
1992	Extracción de la muestra acidificada en tolueno; Extracción con tiosulfato y bromuro cuprico; Reextracción en benceno	GC-ECD	LOD: 5 ng.g <sup>-1</sup>	172
1992	Tratamiento con KOH/metanólico; Derivatización con NaBEt <sub>4</sub> ; Purga y atrapado criogénico	CVAFS	LOD: 0,5 ng.g <sup>-1</sup>	116
1993	Tratamiento KOH metanólico mediante ultrasonidos 2h; Derivatización con NaBEt <sub>4</sub> ; Purga y atrapado criogénico	GC-CVAAS		132
1993	Tratamiento con NaCl/HCl mediante ultrasonidos 30 min; Complejación con cisteína	LC-CVAAS	LOD: 200 ng.g <sup>-1</sup> (1g)	173
1993	Extracción de la muestra acidificada en tolueno; Complejación con cisteína	EC-UV		174
1993	Columna de tierra de diatomeas-HCl; elución cloroformo; Extracción con tiosulfato	HPLC-AAS	LOQ: 100 ng.g <sup>-1</sup>	175
1994	Tratamiento con NaOH; Extracción con cisteína; Reextracción en tolueno	GC-ECD		117

Tabla I.2.6. Resumen de métodos de determinación de especies de mercurio en muestras de material biológico.

Año	Preparación de muestra	Separación/ Detección	Obs.	Ref.
1994	Tratamiento con ácido HNO <sub>3</sub> , H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 90°C 6-8h o básico con KOH/MeOH 70°C 3h; Derivatización con NaBEt <sub>4</sub> ; Purga y atrapado en Carbotrap	GC- pirolisis- AFS	LOD: 1,4 ng.g <sup>-1</sup>	176
1994	Extracción de la muestra acidificada en tolueno; Extracción en tiosulfato  Tratamiento con KOH/MeOH	CVAAS		121
1994	Lavado con acetona; Extracción de la muestra acidificada con Tolueno	GC-MIP- AES		106
1995	Tratamiento con KOH/MeOH en ultrasonidos; Derivatización con NaBEt <sub>4</sub> ; HS SPME PDMS 10 min 25°C	GC-MS(EI)		81
1995	SFE: Tratamiento con NaOH y HCl con polvo de celulosa P 200 atm, T 50°C 20 min. Atrapado en tiosulfato, Elución con HCl	CVAAS	LOD: 100 ng.g <sup>-1</sup> (0,2 g)	153
1996	Tratamiento con KOH metanólico a 75°C 3h; Extracción en DCM; Reextracción en fase acuosa; Derivatización con NaBEt <sub>4</sub> ; Purga y Atrapado	GC-CVAFS	LOD: 0,08 ng.g <sup>-1</sup> (0,1 g)	118
1996	Lavado con acetona; Extracción de la muestra acidificada con Tolueno; Extracción en cisteína	EC-UV	LOD: 12 ng.g <sup>-1</sup>	110
1996	SFE: Dispersión con celita, elución con tolueno; Extracción en cisteína; Reextracción en tolueno	GC-ECD		154
1997	Destilación ácida (NaCl, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) con nitrógeno a 140°C 45 min; Complejación con SPDC	HPLC-UV- PCO- CVAAS	LOD: 0,04 ng.g <sup>-1</sup> (1 g)	124
1997	Destilación ácida (KCl, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) con nitrógeno a 180°C 45 min; Complejación con SPDC	HPLC- HPF/HHPN- ICP-MS	LOD: 0,025 ng.g <sup>-1</sup> (0,5 g)	160
1997	Destilación ácida con nitrógeno a elevada temperatura; Complejación con SPDC	HPLC-UV- PCO-CVAFS	LOD: 0,015 ng.g <sup>-1</sup> (0,5 g)	161

Tabla I.2.6. Resumen de métodos de determinación de especies de mercurio en muestras de material biológico.

<b>Año</b>	<b>Preparación de muestra</b>	<b>Separación/ Detección</b>	<b>Obs.</b>	<b>Ref.</b>
1997	MAE: TMAH o KOH metanólico 40W 3 min; Derivatización con NaBH <sub>4</sub> ; Purga y Atrapado criogénico	GC-ETAAS	LOD: 3 ng.g <sup>-1</sup>	138
1997	Extracción de la muestra acidificada con Tolueno; Complejación con ditizona	EC-UV	LOD: 2 ng.g <sup>-1</sup> (10 g)	177
1997	Tratamiento con TMAH; Derivatización con NaBEt <sub>4</sub> ; Purga y Atrapado en Tenax	GC-FAPES-AES	LOD: 0,2 ng.g <sup>-1</sup> Hg y 1,4 ng.g <sup>-1</sup> MeHg (0,25 g)	115
1997	MAE: TMAH 20 min 20W; Derivatización con NaBEt <sub>4</sub> ; Extracción en hexano	GC-MIP-AES	LOD: 3 pg.g <sup>-1</sup> (0,2g)	141
	MAE: TMAH 20 min 20W; Derivatización con NaBH <sub>4</sub> ; Purga y Atrapado	GC-MIP-AES	LOD: 12,5 pg.g <sup>-1</sup> (0,2g)	
1998	Tratamiento con KOH 4h; Derivatización con NaBEt <sub>4</sub> ; HS SPME PDMS	GC-AFS	LOD: 6,6 ng.g <sup>-1</sup> (0,2g)	92
1998	MAE: TMAH 45 W 2,5 min; Derivatización con NaBEt <sub>4</sub> ; Extracción en hexano	GC multicap-MIP-AES	LOD: 20 ng.g <sup>-1</sup> MeHg, 80 ng.g <sup>-1</sup> Hg (0,2 g)	142
1998	Extracción de la muestra acidificada con Tolueno con DDTc; Derivatización con Reactivo de Grignard	GC-GD-AES		103
1998	MAE: TMAH 60 W 2 min; Derivatización con NaBH <sub>4</sub> ; Purga y atrapado criogénico	GC-GFAAS	LOD: 3 ng.g <sup>-1</sup>	53
1998	MAE: TMAH 45 W 2,5 min; Derivatización con NaBEt <sub>4</sub> ; Purga y atrapado criogénico	GC multicap - MIP-AES	LOD: 0,1 ng.g <sup>-1</sup> MeHg; 0,5 ng.g <sup>-1</sup> Hg	143
1998	Destilación ácida (KCl/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) a 140°C 90 min; Derivatización con NaBEt <sub>4</sub> ; Purga y atrapado en Tenax	GC-ICP-MS	LOD: 10 pg	125
1999	MAE: TMAH 45W 2,5 min; Derivatización con NaBEt <sub>4</sub> ; Purga y atrapado criogénico	GC multicap-ICP-MS	LOD: 0,2 ng.g <sup>-1</sup> MeHg; 0,2 µg.g <sup>-1</sup> Hg	144

Tabla I.2.6. Resumen de métodos de determinación de especies de mercurio en muestras de material biológico.

Año	Preparación de muestra	Separación/ Detección	Obs.	Ref.
1999	MAE: 6M HCl y tolueno 10 min 100°C; Extracción en cisteína; Reextracción en tolueno	GC-ECD	LOD: 8 ng.g <sup>-1</sup>	150
2000	Digestion con KOH-metanol 3h 75°C; Extracción en DCM; Reextracción en agua; Derivatización con NaBPh <sub>4</sub> ; Extracción en tolueno	GC-MIP- AES	LOD: 600-100 ng.g <sup>-1</sup>	119
2000	Lixiviación ácida (NaCl, HCl) ultrasonidos 1h; Derivatización con NaBEt <sub>4</sub> ; Extracción en nonano	GC-MIP- AES  GC-ICP-MS	LOD: 4,4 ng.g <sup>-1</sup> ; 2,6 ng.g <sup>-1</sup> (50 mg)	128
2000	Tratamiento con HCl/NaCl; SPME: PDMS/DVB 10 min 50°C	ICP-MS		88
2000	Tratamiento con TMAH en ultrasonidos 2 h	EC-ICP-MS	LOD: 13,6 ng/mL MeHg; 6,0 ng/mL Hg	133
2000	MAE: ácido acético 100°C 6 min; Derivatización con NaBPh <sub>4</sub> ; Extracción en tolueno	GC-MIP- AES	LOD: 8 ng.g <sup>-1</sup> (0,1 g)	178
2000	Extracción de la muestra acidificada (HCl, NaCl) en Tolueno con DDTC; Derivatización con Reactivo de Grignard	GC-rf-HC- GD-AES	LOD: 0,2 pg MeHg y EtHg, 0,3 pg Hg (0,25g)	104
2002	MAE: acido acetico glacial 60W 4 min; Derivatización con NaBPh <sub>4</sub> ; SPME: PDMS 60 min T°amb	GC-MIP- AES	LOD : 1-2 ng.g <sup>-1</sup> (1 g)	179
2002	MAE: TMAH 45W 2,5min; Derivatización con NaBEt <sub>4</sub> ; Extracción en isooctano	GC-ICP-MS		145
2002	Tratamiento con HCl en ultrasonidos 5 min; Extracción con DCM	GC- pirolisis- CVAFS	LOD: 1,2 pg (0,3 g)	129
2002	Tratamiento con TMAH, en ultrasonidos 1h	HPLC-ICP- MS		134
2002	Muestreo solido (SS)- vaporizacion electrotermica (ETV)	ICP-MS	LOD: 2 ng.g <sup>-1</sup> MeHg, 6 ng.g <sup>-1</sup> Hg	180

Tabla I.2.6. Resumen de métodos de determinación de especies de mercurio en muestras de material biológico.

Año	Preparación de muestra	Separación/ Detección	Obs.	Ref.
2003	Tratamiento con KOH/MeOH en ultrasonidos 4h; Derivatización con NaBEt <sub>4</sub> ; HS SPME: PDMS 10 min + 2min 22°C	GC-FAPES	LOD: 1,5 ng.g <sup>-1</sup> (MeHg) 0,7 ng.g <sup>-1</sup> (Hg(II)) (0,25g)	135
2003	Tratamiento con KOH/MeOH en ultrasonidos; Microcolumna con un complejo de Cu y dietilditiocarbamato absorbido, elución con etanol	ETAAS	LOD: 3,4 ng.g <sup>-1</sup> (0,1g)	136
2003	Tratamiento con KOH/MeOH; Derivatización con NaBPr <sub>4</sub> ; HS SPME-PDMS 10 min	GC-ICP-MS	LOD: 2,1 ng.g <sup>-1</sup>	120
2003	Tratamiento con KOH/MeOH; Derivatización con NaBPr <sub>4</sub> ; HS SPME-PDMS 10 min	GC-MS	LOD: 37 ng.g <sup>-1</sup>	181
2003	Tratamiento con KOH/MeOH; Derivatización con NaBPr <sub>4</sub> ; SPME PDMS 10 min	GC-FAPES	LOD: 0,23-0,55 ng.g <sup>-1</sup> (0,25 g)	182
2003	MAE: TMAH 40W 2 min; Derivatización con NaBEt <sub>4</sub> ; Extracción en isoootano	GC-ICP-MS	LOD: 0,11 ng.g <sup>-1</sup> MeHg, 0,24 ng.g <sup>-1</sup> Hg (0,25 g)  Determinación simultanea de Hg y Sn	146
2004	MAE: TMAH adición de Cu 45W 2,5 min; Derivatización con NaBPr <sub>4</sub> ; Extracción en n-heptano	GC-MS	LOD: 40 ng.g <sup>-1</sup> (0,5 g)	147
2004	MAE: TMAH 2 min 40W; Derivatización con NaBEt <sub>4</sub> ; HS SPME: 25°C 12 min	GC multicap-ICP-TOF-MS	LOD 1,3 pg.g <sup>-1</sup> MeHg; 2 pg.g <sup>-1</sup> Hg(II) (0,3 g)  Especiación multielemental PDMS/DVB, para Hg CAR/PDMS 75um	148
2004	Tratamiento con HCl en ultrasonidos 10 min; columna con APDC y Cu, elución con metanol	HPLC-UV	LOD: 10-25 ng.g <sup>-1</sup> (0,5 g)	130



#### **I.2.2.2.7. Preconcentración y Limpieza**

Para la introducción del extracto en la técnica de separación, es necesario que éste tenga unas características determinadas que dependen de la técnica.

Las técnicas de cromatografía de gases requerirán un disolvente no polar libre de partículas en suspensión que contenga especies volátiles térmicamente estables. Por lo tanto, en algunos casos tras el proceso de pre-tratamiento es necesario un paso de extracción de los analitos a un disolvente orgánico<sup>100,117</sup>, normalmente se utiliza benceno o tolueno. En algunos procedimientos de preparación de muestra se lleva a cabo una reacción de derivatización<sup>101,102,103,118,126,140</sup> a especies con mejores características cromatográficas, reacción que también puede realizarse simultáneamente con la extracción<sup>119,139,141,145,147,159,163,178</sup>.

La introducción de la muestra se puede realizar por inyección directa, por purga y atrapado de los analitos, cromatografía de gases con espacio de cabeza o mediante SPME.

El método mas usado de preconcentración es el de purga y atrapado. Esto puede realizarse mediante trampas criogénicas<sup>53,116,132,144</sup> (que se encuentran a temperaturas muy bajas normalmente con nitrógeno líquido) o trampas de tenax<sup>115,123,127</sup> o carbotrap<sup>95,176</sup>. La elución de estos compuestos se realiza térmicamente con un aumento de la temperatura. La cromatografía en espacio de cabeza<sup>44,113,114</sup> difiere de la purga y atrapado en que los compuestos se transfieren directamente a la columna cromatográfica en vez de ser atrapados primero en una trampa. En ambos

casos, los analitos son previamente derivatizados a compuestos más volátiles.

La microextracción en fase sólida (SPME)<sup>81,84,88,120,135,179,182</sup>, como ya se ha indicado, combina la extracción, pre-concentración e introducción de la muestra, normalmente, en el sistema cromatográfico. Se ha utilizado como técnica de limpieza y pre-concentración tras el tratamiento de la muestra con ácidos o bases y derivatización de los analitos.

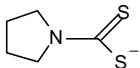
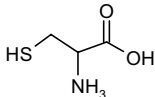
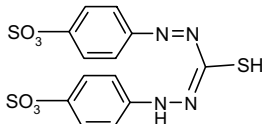
Para técnicas basadas en cromatografía líquida o electroforesis capilar se requerirán soluciones acuosas de especies estables termodinámicamente, inertes cinéticamente y libres de partículas en suspensión. En algunos casos para mejorar las propiedades cromatográficas y de detección UV, es necesario formar complejos, normalmente se utiliza cisteína<sup>110,173</sup>, carbamatos<sup>124,162</sup> y ditizona<sup>177</sup>.

### **I.2.2.3. DERIVATIZACIÓN**

La derivatización se utiliza para obtener especies con mejores características para la separación o para la detección.

La mayoría de las especies organometálicas existen en forma iónica con relativamente altos puntos de ebullición y una baja estabilidad térmica. Para mejorar su separación por GC, estas especies deben convertirse en especies no polares, volátiles y térmicamente estables. Los métodos de derivatización más comunes incluyen: conversión de iones inorgánicos y organometálicos en compuestos covalentes volátiles (hidruros, alquilados) en medio acuoso y conversión de cationes alquilmetálicos con reactivos de Grignard para saturar los grupos no polares.

Tabla I.2.7. Principales agentes derivatizantes.

Tipo	Agente	Ejemplo
Volatilización	Haluro	Ácido Iodoacético
	Hidruro	NaBH <sub>4</sub>
	Reactivo de Grignard	RMgX (BuMgCl)
	Agente Alquilante	NaBEt <sub>4</sub> , NaBPh <sub>4</sub> , NaBPr <sub>4</sub>
Complejación	Carbamato	 Pirrolidín ditiocarbamato
	Cisteína	
	Ditizona	 Sulfato de ditizona

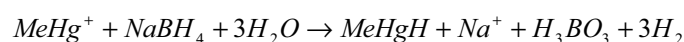
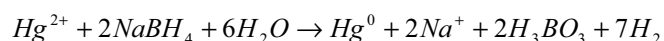
Los compuestos de mercurio no absorben a longitudes de onda de UV-VIS, por lo tanto para el uso de esta técnica de detección, acoplada a EC o LC, es necesaria la formación de complejos quelatos que absorban a estas longitudes de onda. Principalmente se utilizan como agentes quelatantes el ditiocarbamato, ditizona y cisteína.

#### I.2.2.3.1. Formación de haluros más volátiles

Algunos investigadores han usado métodos de volatilización de metilmercurio para evitar extracciones. Por ejemplo, Lansens y Baeyens<sup>114</sup> y Decadt<sup>113</sup> separan MeHg<sup>+</sup> de material biológico por tratamiento con ácido sulfúrico en un vial cerrado y conversión del MeHg<sup>+</sup> en MeHgI por adición de ácido iodoacético.

### **I.2.2.3.2. Generación de hidruros**

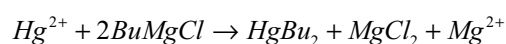
La generación de hidruros se ha empleado para la determinación de un amplio rango de especies elementales. El metilmercurio y mercurio (II) pueden transformarse en hidruros volátiles<sup>52,53,54,55,141,171,183</sup> por tratamiento con NaBH<sub>4</sub> en fase acuosa:



Esta técnica puede presentar interferencias debidas a metales de transición que pueden afectar al rendimiento de la reacción y a la precisión analítica. La presencia de altas concentraciones de sales (NaCl) favorece la reducción de MeHg<sup>+</sup> a Hg<sup>0</sup>, pero este problema se puede solucionar empleando AEDT<sup>183,184</sup>.

### **I.2.2.3.3. Reactivos de Grignard**

En este método, las especies organometálicas son peralquiladas en especies volátiles apolares<sup>66,67,69,102,103,112</sup>:



La principal ventaja es su versatilidad, se hace uso de más de 30 reactivos de Grignard disponibles comercialmente. La principal desventaja es la sensibilidad del reactivo hacia el agua, y también al aire, por lo tanto, los analitos deben extraerse primero en un disolvente no polar, aprótico y seco. Además, los reactivos de Grignard tienen una pureza insuficiente para la especiación de metales a niveles traza.

Hay un riesgo de transalquilación de especies orgánicas de mercurio cambiando las concentraciones de las especies de mercurio y también las reacciones con haluros pueden producir recuperaciones no cuantitativas<sup>41</sup>. La derivatización con reactivos de Grignard es aplicable a extractos que contienen complejos de los compuestos organometálicos con ditizona o ditiocarbamatos<sup>66,102</sup>. Los reactivos de Grignard que no han reaccionado tienen que ser destruidos antes de la inyección del extracto derivatizado en la columna, esto se alcanza por agitación con ácido sulfúrico diluido.

#### **I.2.2.3.4. Tetra alquil-/aril- Boratos**

Los compuestos de tetra alquil-/aril- borato se han utilizado como reactivos de derivatización en numerosas publicaciones relacionadas con el análisis de especiación de compuestos organometálicos ya que la reacción se realiza en disolución acuosa y es una alternativa a la generación de hidruros que es muy vulnerable a las interferencias en muestras reales. Además se puede realizar la derivatización y la extracción en un disolvente orgánico en un solo paso.

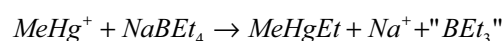
Los principales tetra alquil-/aril- boratos usados como derivatizantes son: tetraetilborato sódico ( $\text{NaBEt}_4$ ), tetrafenilborato sódico ( $\text{NaBPh}_4$ ) y tetrapropilborato sódico ( $\text{NaBPr}_4$ ).

La alquilación de compuestos organometálicos con tetraalquilboratos es fuertemente dependiente del pH. La derivatización con  $\text{NaBPr}_4$  puede utilizarse a pH de 4,5 a 6, con  $\text{NaBPh}_4$  debe utilizarse un intervalo de pH de 2 a 6, mientras que con  $\text{NaBEt}_4$  debe trabajarse alrededor de 5.

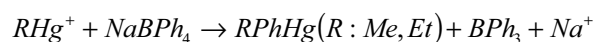
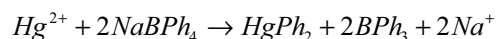
## EL MERCURIO

---

El  $\text{NaBEt}_4$ <sup>40,44,48,49,51,53,57,61,81,116,128,132,135,139,140,144,146,159,176</sup> es el más usado. Su disolución es bastante estable pero debe prepararse inmediatamente antes de su uso. Fue introducido por Rapsomanikis y Craig<sup>101</sup> en la derivatización de compuestos organomercurícos. Una limitación importante en los estudios de especiación es la imposibilidad de diferenciación las especies de etilmercurio del mercurio inorgánico y además, la etilación del metilmercurio sufre interferencias por la presencia de iones cloruro<sup>184</sup>. El  $\text{NaBEt}_4$  permite la derivatización multielemental y multiespecie de Sn, Hg y Pb<sup>58,63,82,83,84,89,148</sup>:



La fenilación con  $\text{NaBPh}_4$  fué propuesta por Lückow y Russel<sup>185</sup>. El  $\text{NaBPh}_4$  sólo reacciona con el mercurio inorgánico y los alquilmercuriales lo que elimina posibles interferencias de otros metales:



De Smaele y col.<sup>42</sup> propusieron el uso de  $\text{NaBPr}_4$  para la determinación de especies de mercurio<sup>60,86,120,147,182</sup>. El  $\text{NaBPr}_4$  permite la derivatización multielemental y multiespecie<sup>42</sup>.

Tanto el  $\text{NaBPh}_4$  como el  $\text{NaBPr}_4$  están disponibles comercialmente y combinan dos ventajas, su fácil manipulación para la derivatización-extracción in situ, y la posibilidad de distinguir entre el etilmercurio y el mercurio inorgánico. Además, son más baratos y sus disoluciones son más estables que el  $\text{NaBEt}_4$ .

La derivatización con  $\text{NaBPh}_4$  se ve afectada por el uso en la digestión de TMAH, ya que el ion tetrametilamonio forma con el tetrafenilborato sódico un precipitado blanco de baja solubilidad<sup>179</sup>.

#### **I.2.2.3.5. Formación de quelatos**

La formación de quelatos permite la detección de las especies de mercurio mediante detección UV y mejora la separación de las diferentes especies, los agentes quelatantes más usados son los carbamatos<sup>93,124,130,160,161,162</sup>, la cisteína<sup>110,173,174</sup> y la ditizona<sup>177</sup>.

#### **I.2.2.4. SEPARACIÓN Y DETECCIÓN**

La metodología analítica más usada para la especiación combina la separación cromatográfica con un sistema de detección altamente específico.

Los métodos más comunes para la especiación de mercurio son la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acopladas con un detector específico de mercurio. Los métodos de detección acoplados con técnicas cromatográficas para la especiación de mercurio incluyen espectroscopia de absorción atómica (AAS), espectroscopia de fluorescencia atómica (AFS), plasma de acoplamiento inductivo–espectrometría de masas (ICP–MS), plasma de acoplamiento inductivo–espectrometría de emisión atómica (ICP–AES) y plasma inducido por microondas–espectroscopia de emisión atómica (MIP–AES). Estos métodos de detección son adecuados para la especiación de mercurio debido a sus excelentes límites de detección y selectividad.

#### I.2.2.4.1. Cromatografía de Gases (GC)

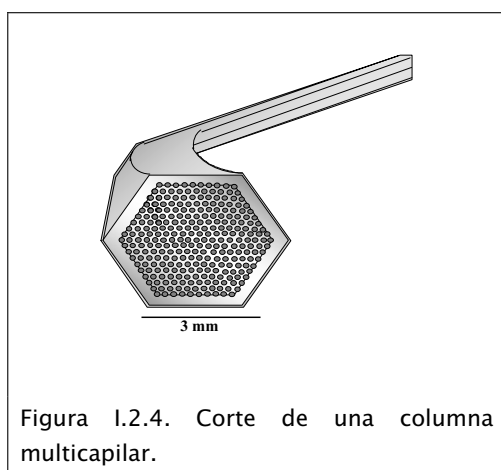
La cromatografía de gases requiere que las especies de analito se presenten como compuestos no polares, térmicamente estables en disolventes no polares. La preparación de la muestra debe incluir un paso de transferencia de los analitos de la disolución acuosa en un disolvente orgánico o un paso de pre-concentración sobre un absorbente cromatográfico por purga y atrapado o microextracción en fase sólida.

Se pueden presentar durante la separación cromatográfica algunos problemas. La separación cromatográfica de compuestos con enlace haluro-mercurio llevan a picos cromatográficos con largas colas, debido a su elevada polaridad y a que puede interaccionar con la fase estacionaria de la columna.

Para evitar este problema se han usado varias alternativas, en primer lugar la pasivación<sup>100,106,108,109</sup> de la columna que consiste en el acondicionamiento de dicha columna usando una disolución de cloruro de mercurio en un disolvente orgánico (benceno o tolueno). Pero este procedimiento debe repetirse frecuentemente ya que la eficiencia de la columna se deteriora con el tiempo. Una alternativa para alcanzar el óptimo de eficiencia es la formación de derivados alquilados<sup>42,101,185</sup> (derivatización) no polares que tienen características cromatográficas mejores. El paso de derivatización para obtener especies térmicamente estables puede seguir al paso de extracción en el disolvente (derivatización de Grignard) o precederlo (derivatización con NaBH<sub>4</sub> o NaBEt<sub>4</sub>).



Para mejorar los límites de detección, se han mejorado aspectos en la separación cromatográfica con la introducción de la columna multicapilar. Se obtiene una excelente resolución a pesar de los tiempos de retención realmente cortos y la separación total puede conseguirse en menos de un minuto<sup>143</sup>.



El aumento en la velocidad se debe al diseño especial de la columna multicapilar (figura I.2.4) que ensambla un haz de 900–2000 columnas microcapilares con diámetros internos de 20 a 40  $\mu\text{m}$ . Este diseño permite aplicar flujos mucho más grandes que en las

columnas normales. Este mecanismo se ha usado con MIP–AES<sup>62,139,142,143</sup> o ICP–MS<sup>148</sup>.

Los detectores que se han usado acoplados con cromatografía de gases son: detector de captura electrónica (ECD)<sup>76,97,100,102,107,108,117,131,149,154,168,172</sup>, espectroscopia de fluorescencia atómica (AFS)<sup>40,44,48,50,52,54,56,78,79,111,129,176</sup>, espectroscopia de absorción atómica (AAS)<sup>53,87,101,138</sup>, espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)<sup>171</sup>, espectroscopia de emisión atómica (AES)<sup>41,45,47,65,66,69,77,85,103,106,112,113,115,119,159,166,178</sup>, espectrometría de masas (MS)<sup>43,81,147,163,181</sup> y plasma acoplado por inducción–espectrometría de masas (ICP–MS)<sup>42,51,60,82,84,86,125,140,146</sup>.

Cai y col.<sup>59</sup> comparan la detección mediante AFS, AES y MS. Los límites de detección que se obtienen son muy bajos para AFS y AES (0,02–0,04 pg) y bastante más altos para MS (30–50 pg).

Los métodos de espectroscopia atómica<sup>55,63,139</sup>, MS<sup>83,89</sup> y ICP-MS<sup>42,82,84,146,147</sup> permiten el análisis multielemental y multiespecie y se han utilizado para la especiación simultánea de estaño, plomo y mercurio.

### **GC-ECD**

En el método clásico de Westöö<sup>97,98</sup> se estableció la separación y detección de metilmercurio mediante GC-ECD. El mayor problema con GC-ECD es que el MeHgCl es muy corrosivo para columnas empaquetadas y capilares. Para evitar este problema cromatográfico, se ha intentado convertir los alquilmercuriales durante la etapa de limpieza en sus derivados bromados que resultan menos agresivos, ya que las especies derivatizadas alquiladas que resuelven los problemas cromatográficos no pueden detectarse mediante ECD debido a la ausencia del halógeno.

### **GC-AFS**

Se han utilizado para la determinación del eluyente cromatográfico detectores de array, usando diferentes combinaciones debido a la fácil descomposición térmica de los compuestos de alquilmercurio y la volatilidad del Hg<sup>0</sup>, como espectrometría de fluorescencia atómica de vapor frío<sup>56,87,95,118,132</sup> (CVAFS) usando una celda de cuarzo de sílice fundida o mediante pirólisis o descomposición electrotérmica.

**GC-AES:**

La solución más frecuente es el uso de espectroscopia de emisión atómica con plasma para la determinación de organomercuriales tras la separación cromatográfica debido a que evita el paso de descomposición.

En la especiación elemental, la interfase cromatografía-espectroscopía de emisión de plasma atómico tiene las siguientes ventajas: monitoriza los eluatos por su composición elemental con sensibilidad alta, determina los elementos objetivo con gran selectividad sobre elementos que co-eluyen y detecta varios elementos de manera simultánea. Las fuentes de emisión de plasma son el plasma de helio inducido por microondas (MIP), el plasma de corriente directa de argón (DCP), el plasma de corriente alterna (ACP), acoplado por capacidad (CCP), el plasma inducido por radiofrecuencias (RFP), el plasma acoplado inductivamente (ICP) y el plasma de atomización en cámara (FAPES), siendo la fuente más utilizada el plasma de helio inducido por microondas (MIP)<sup>186</sup>.

La cromatografía de gases con detección de emisión atómica con una interfase de plasma inducido por microondas (MIP) fue descrito por McCormack y col.<sup>187</sup> en 1965. El detector responde solamente cuando una molécula conteniendo ese elemento es eluído, monitorizando las longitudes de onda de emisión que son específicas para un elemento particular. En un MIP, se inicia y se sustenta un plasma de helio en una cavidad de microondas en la cual la energía de una fuente de magnetron, típicamente a 2,45 GHz, se enfoca en una celda de descarga hecha de cuarzo o de otro material refractario.

#### **GC-ICP-MS:**

El acoplamiento del plasma acoplado inductivamente con la espectrometría de masas tiene las ventajas de las dos técnicas, obteniendo una técnica con una muy alta sensibilidad y gran selectividad sobre los elementos e incluso sobre los diferentes isótopos de los elementos.

#### **I.2.2.4.2. Cromatografía Líquida (LC)**

Para técnicas basadas en cromatografía líquida se requerirán disoluciones acuosas de especies estables termodinámicamente, inertes cinéticamente y libres de partículas en suspensión.

HPLC tiene la ventaja sobre GC que no es necesaria la formación de especies derivadas volátiles. Con este método no es necesario el paso de derivatización y se pueden determinar especies menos volátiles como compuestos de mercurio aromáticos.

Las especies se han separado principalmente por cromatografía de par iónico en fase reversa. Normalmente, a la fase móvil se le añade 2-mercaptoetanol<sup>68,161,170,188</sup>, aunque también se pueden utilizar otros formadores de par iónico o agentes complejantes como ditiocarbamatos N,N-di-sustituídos<sup>124,160,162,189</sup> o cisteína<sup>70,90,134,173</sup>. En algunos casos se han separado el metilmercurio y el mercurio inorgánico mediante cromatografía líquida micelar usando micelas de bromuro de dodecildimetilamonio (SDS)<sup>74</sup>.

El mayor problema de las técnicas de separación líquida es la sensibilidad del detector, que determina el límite de detección del sistema. Con los métodos clásicos que se aplican a la cromatografía líquida como UV<sup>130,190</sup> o AAS<sup>74,90,91,93,124,170,173,175</sup>, se alcanzan límites de detección del rango de nanogramos. Este no es adecuado para el análisis directo de trazas en muestras medioambientales. Estos límites si pueden alcanzarse con otras técnicas de detección específicas como AFS<sup>161,164</sup> e ICP-MS<sup>68,70,134,160,162</sup>.

### **HPLC-UV**

La detección mediante espectroscopia UV<sup>130,190</sup> se basa en la medida de la absorbancia de un complejo de ditizona o carbamato, que podría incluir el uso de HPLC con coloración pre-columna o post-columna.

### **HPLC-AAS/AFS**

Usando detección de AAS, se puede obtener la sensibilidad requerida mediante un paso de preconcentración seguido de una oxidación postcolumna<sup>91,124</sup>. Se forman los complejos de mercurio ditiocarbamato, se separan en la columna en fase reversa y se descomponen por radiación UV en un paso de oxidación post columna. El siguiente paso es la conversión a mercurio elemental por reducción con NaBH<sub>4</sub>. En un separador gas-líquido el mercurio vapor es barrido en el AAS por una corriente de un gas inerte.

AFS da excelentes límites de detección y se ha utilizado frecuentemente en la especiación de mercurio.

### **HPLC-ICP-MS**

La mayor sensibilidad se alcanza para especies de mercurio con detección ICP-MS<sup>68,188</sup>, si se utiliza la oxidación/volatilización post-columna pueden mejorarse los límites de detección<sup>160</sup>.

#### **I.2.2.4.3. Electroforesis Capilar (CE)**

La electroforesis capilar se ha convertido en una poderosa técnica analítica para la separación de una variedad de analitos de iones inorgánicos pequeños a grandes biomoléculas. Las ventajas de la separación por CE incluyen alta eficiencia, pequeño volumen de muestra y mínimo consumo de tampón.

La electroforesis capilar con detección UV se ha aplicado a la determinación de metilmercurio en muestras biológicas<sup>94,110,174,177,191</sup>. Sin embargo, estos métodos están limitados por la insuficiente sensibilidad y pobre selectividad del detector, lo que produce altos límites de detección, interferencias y líneas de base inestables. Además, es necesario el uso de agentes derivatizantes que contienen azufre (cisteína<sup>174</sup>, ditizona<sup>177</sup> o ácido nitrilotriacético<sup>94</sup>) para obtener complejos estables que absorban en la región ultravioleta.

Por lo tanto, es necesario buscar técnicas más sensibles y de detección específica de elementos. Tu y col.<sup>133</sup> desarrollaron el acoplamiento de CE con ICP-MS que combina la eficiencia de separación de la CE con la detección de alta sensibilidad, elemental y específica del ICP-MS.

### **I.2.2.5. PROBLEMAS EN LA ESPECIACIÓN**

La determinación de metilmercurio es compleja debido a la presencia de problemas relacionados con la obtención de recuperaciones no cuantitativas y la posibilidad de formación de artefactos y transformaciones de metilmercurio durante la etapa de preparación de muestra. La formación de artefactos podría estar relacionada con transformaciones químicas de la matriz de la muestra durante la extracción-preconcentración, causando la liberación de metiladores que pueden reaccionar con el mercurio inorgánico presente en la disolución de la muestra. En estudios de agua natural, la materia orgánica disuelta (DOC) ha sido repetidamente identificada como componente de la matriz responsable de la formación de artefactos de metilmercurio. Algunos reactivos usados en la extracción-preconcentración son también metiladores potenciales de mercurio, encontrándose en algunos casos que la producción de metilmercurio no depende de la matriz de la muestra.

La mayoría de los artefactos de metilmercurio se forman durante la extracción<sup>49,192</sup> y representan la verdadera metilación abiótica del mercurio inorgánico. La cantidad de metilmercurio producido durante la extracción está relacionada con la cantidad de mercurio inorgánico en la muestra y el método de extracción<sup>49,192,193</sup>.

Los tejidos de peces parecen no sufrir la formación de artefactos pero las muestras de sedimentos muestran grandes errores<sup>194</sup>. En sedimentos naturales se encuentran cantidades de metilmercurio muy bajas representando sólo el 0,5–2% del mercurio total, por lo tanto, incluso si ocurre la metilación en pequeña proporción 0,02–0,03% del mercurio

inorgánico, esto puede producir una sobreestimación del 30–80% de la concentración del metilmercurio en el sedimento<sup>192</sup>.

La Comisión Europea ha financiado un estudio para poder evaluar los problemas que presentan los valores de metilmercurio en materiales de referencia, las conclusiones se resumieron en un número de la revista de ámbito internacional *Chemosphere*<sup>195</sup> publicado en 1999. Se evaluaron sistemáticamente las causas y factores relacionados con la formación de metilmercurio durante el análisis<sup>196</sup>. Se estudiaron diferentes técnicas para la extracción de metilmercurio de diferentes matrices para evaluar la potencial generación del metilmercurio a partir del mercurio inorgánico. Los resultados mostraron la posibilidad de transformaciones durante el paso de pre-tratamiento de muestra y, más específicamente, usando métodos basados en la destilación. Estas observaciones se basaban en la metilación de mercurio inorgánico adicionado, sin tener en cuenta posibles transformaciones del metilmercurio adicionado.

Hintelmann y col.<sup>192</sup> investigaron la metilación abiótica de mercurio inorgánico añadido cuando la matriz se sometía a varios procedimientos de preparación de muestra como destilación, lixiviación ácida o extracción alcalina de diferentes muestras medioambientales. Dependiendo del procedimiento de pre-tratamiento usado y de la matriz de la muestra la metilación abiótica del mercurio varía desde 0,005% de la lixiviación ácida de sedimentos con ácido clorhídrico al 4,3% de la extracción alcalina de muestras de pescado con TMAH.

Lambertsson y col.<sup>127</sup> determina una metilación abiótica de mercurio inorgánico en sedimentos de 0,05%, usando extracción



ácida/enriquecimiento con  $\text{KBr}/\text{H}_2\text{SO}_4/\text{CuSO}_4$  en diclorometano y etilación seguida de GC-ICP-MS. Bloom y col.<sup>49</sup> encuentra con el mismo pre-tratamiento de muestra una metilación abiótica 25 veces más baja en un sedimento material de referencia, 0,002%.

Qvarnström y Frech<sup>134</sup> estudia las transformaciones de las especies durante diferentes pasos de pre-tratamiento de muestra usando patrones enriquecidos de  $\text{Me}^{198}\text{Hg}^+$  y  $^{201}\text{Hg}^{2+}$  y HPLC en combinación con SSID (adición de isótopos específicos de especies)-ICP-MS. Determinando un metilación del 11,5% del mercurio inorgánico y una demetilación del 6,26% del metilmercurio.

Rodríguez Martín-Doimeadios y col.<sup>197</sup> estudian la formación de metilmercurio en materiales de referencia de sedimentos (CRM 580, IAEA 356 y IAEA 405) usando SSID combinada GC-ICP-MS usando extracción ácida asistida por microondas. Se obtienen recuperaciones de metilmercurio entre 148 y 413%, que corresponde a porcentajes de metilación entre 0,07 y 0,34%. Sugieren la posible relación entre la formación de metilmercurio y los niveles de carbono y azufre en el sedimento.

Recientemente, Rahman y Kingston<sup>198</sup> evalúan diferentes métodos de extracción selectiva para la especiación de mercurio en sedimentos utilizando HPLC acoplado a ICP-MS y los resultados se comparan con los obtenidos con el método 3200 de la EPA. Los métodos evaluados están basados en la sonicación, extracción asistida por microondas y extracción ácida fría. Como ninguno de estos métodos puede corregir ninguna interconversión o transformación de mercurio inorgánico a metilmercurio o

viceversa, se usa como herramienta de diagnóstico el método 6800 de la EPA (SIDMS, espectrometría de masas con dilución isotópica elemental y de especies). Como resultado concluyen que, el método 3200 de la EPA, sonicación con ácido nítrico y extracción asistida por microondas con ácido nítrico presentan menos eficiencia de extracción para mercurio inorgánico pero bastante alta para metilmercurio, y no introducen interconversión de mercurio inorgánico a metilmercurio o viceversa. Por otro lado, la sonicación con ácido clorhídrico y la extracción ácida fría demuestran gran eficiencia en la extracción de mercurio inorgánico pero induce a la conversión de metilmercurio en mercurio inorgánico.

El problema de formación de artefactos se intenta solucionar por eliminación o reducción del mercurio inorgánico de la muestra lo que es un importante factor de la formación de artefactos, o por el uso del método de dilución isotópica específica de especies (SSID).

La reducción del mercurio inorgánico en la muestra (lavado con acetona) elimina la posibilidad de la especiación del mercurio, permitiendo sólo determinar el mercurio orgánico.

La aplicación de la dilución isotópica específica de especies<sup>199</sup> (SSID) en combinación con técnicas que permitan la determinación de isótopos (ICP-MS o MS) permite detectar, cuantificar y corregir este proceso preservando la integridad de todas las especies de interés durante el proceso analítico. Con SSID, se añaden y equilibran con la muestra antes del análisis las especies marcadas del analito de interés, preparadas desde isótopos estables enriquecidos, y las transformaciones de las especies se

reflejarán por la desviación de las relaciones de los isótopos de las especies de su valor natural<sup>134</sup>.

- 
1. Alloway, B.J., "Heavy metals in soils", Blackie & son, Londres (1990). pg. 222–236.
  2. Kabata-Pendias, A.; Pendias, H., "Trace elements in soils and plants", CRC Press, Florida (1984), pg. 116–125.
  3. Hutzinger, O., "The handbook of environmental chemistry; vol 1: The natural environment and the biogeochemical cycles", Springer-Verlag, Berlin (1980), pg. 177–185.
  4. Downs, S.G.; Macleod, C.L.; Lester, J.N., *Water, Air and Soil Pollution* **108** (1998) 149–187.
  5. Quevauviller Ph.; Maier, E.A.; Griepink, B., "Quality Assurance for Environmental Analysis", Elsevier, Amsterdam (1995), pg. 305–317.
  6. Sigel, A.; Sigel, H., "Metal ions in biological systems"; vol 34: "Mercury and its effects on environment and biology", Macel Dekker Inc., New York (1997).
  7. Broekaert, J.A.C.; Gücer, S.; Adams, F., "Metal speciation in the environment", Nato ASI Series, Berlin (1990), pg. 339–358.
  8. Morita, M. ; Yoshinaga, J. ; Edmonds, J.S., *Pure & Appl. Chem.* **70** (1998) 1585–1615.
  9. WHO Environmental Health Criteria 101. Methylmercury. World Health Organiosation, Geneva (1990).

10. WHO Environmental Health Criteria 118. Mercury, inorganic. World Health Organisation, Geneva (1991).
11. WHO Environmental Health Criteria 86. Mercury-Environmental Aspects. World Health Organisation, Geneva (1989).
12. Baeyens, W.; Leermakers, M., *J. Anal. At. Spectrom.* **4** (1989) 635-640.
13. Leemakers, M.; Lansens, P.; Baeyens, W., *Fresenius J. Anal. Chem.* **336** (1990) 655-662.
14. Bisnoti, M.C.; Jardim, W.F., *Quim Nova* **27** (2004) 593-600.
15. Mason, R. P.; Fitzgerald, W. F.; Morel, F. M. M., *Geochim. Cosmochim. Acta* **58** (1994) 3191-3198.
16. WHO Environmental Health Criteria 1. Mercury. World Health Organisation, Geneva (1976).
17. Lacerda, L.D.; Bidone, E.D.; Guimaraes, A.F.; Pfeiffer, W.C., *An. Acad. Bras. Cienc.* **66** (1994) 373-379.
18. Steffan, R. J.; Korthals, E. T.; Winfrey, M. R., *Appl. Environ. Microbiol.* **54** (1988) 2003-2009.
19. Lee, Y. H.; Wangberg, I.; Munthe, J., *Sci. Total Environ.* **304** (2003) 107-113.
20. Gochfeld, M., *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **56** (2003) 174-179.
21. Reglamento (CE) no 466/2001 de la Comisión, de 8 de marzo de 2001, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios, Diario Oficial de las Comunidades Europeas nº L077, 16/03/2001, 0001-0013.

22. Nota Informativa de la *European Commission Health & Consumer Protection*, de 12 de mayo de 2004 sobre: *Methyl mercury in fish and fishery products*. Bruselas (2004).
23. Kurland, L.T.; Faro, S.N.; Siedler, H., *World Neurol* **1** (1960) 370–395.
24. Clarkson, T. W., *Environ. Health Perspect.* **100** (1993) 31–38.
25. Blaney, M.B., *Appl. Occup. Environ. Hyg.* **16** (2001) 233–236.
26. Guimaraes, J.R.; Roulet, M.; Lucotte, M.; Mergler, D., *Sci. Total Environ.* **261** (2000) 1–98.
27. Quevauviller, Ph., *J. Environ. Monit.* **2** (2000) 292–299.
28. Batley, G.E., "Trace Element Speciation: Analytical Methods and Problems", CRC Press, Boca Raton (1987).
29. Kramer, J.R.; Allen, H.E., "Metal Speciation: Theory, Analysis and Application", Lewis, Chelsea (1988).
30. Quevauviller, P., "Method Performance Studies for Speciation Analysis", RSC, Cambridge (1998).
31. Caruso, J.A.; Sutton, K.L.; Ackley, K.L., "Elemental speciation: new approaches for trace element analysis", Elsevier, Amsterdam (2000).
32. Gómez-Ariza, J.L.; Morales, E.; Giradles, I.; Sánchez-Rodas, D.; Velasco, A., *J. Chromatogr. A* **938** (2001) 211–224.
33. Puk, R.; Weber, J.H., *Appl. Organometal. Chem.* **8** (1994) 293–302.
34. Carro, A.M.; Mejuto, M.C., *J. Chromatogr. A* **882** (2000) 283–307.
35. Yu, L.P.; Yan, X.P., *Trends Anal. Chem.* **22** (2003) 245–253.

36. Lansens, P.; Meuleman, C.; Baeyens, W., *Anal. Chim. Acta* **229** (1990) 281–285.
37. Rosain, R.M.; Wai, C.M., *Anal. Chim. Acta* **65** (1973) 279–284.
38. Ure, A.M., *Quim. Anal.* **13** (1994) S64–S69.
39. US EPA–823–R–01–001 de Office of Science and Technology, Office of Water sobre “Water Quality Criterion for the Protection of Human Health: Methylmercury”, Washington (2001).
40. Logar, M.; Horvat, M.; Akagi, H.; Pihlar, B., *Anal. Bioanal. Chem.* **374** (2002) 1015–1021.
41. Emteborg, H.; Snell, J.; Qian, J.; Frech, W., *Chemosphere* **39** (1999) 1137–1152.
42. De Smaele, T.; Moens, L.; Dams, R.; Sandra, P.; van der Eycken, J.; Vanduyck, J., *J. Chromatogr A* **793** (1998) 99–106.
43. Hu, G.; Wang, X.; Wang, Y.; Chen, X.; Jia, L., *Analytical Letters* **30** (1997) 2579–2594.
44. Leermakers, M.; Nguyen, H.L.; Kurunczi, S.; Vanneste, B.; Galletti, S.; Baeyens, W., *Anal. Bioanal. Chem.* **377** (2003) 327–333.
45. Talmi, Y., *Anal. Chim. Acta* **74** (1974) 107–117.
46. Talmi, Y.; Norwell, V.E., *Anal. Chim. Acta* **85** (1976) 203–208.
47. Kato, T.; Uehiro, T.; Yasuhara, A.; Morita, M., *J. Anal. At. Spectrom.* **7** (1992) 15–18.
48. Horvat, M.; Liang, L.; Bloom, N.S., *Anal. Chim. Acta* **282** (1993) 153–168.

49. Bloom, N.S. Colman, J.A.; Barber, L., *Fresenius J. Anal. Chem.* **358** (1997) 371–377.
50. Bowles, K.C.; Apte, S.C., *Anal Chem.* **70** (1998) 395–399.
51. Holz, J.; Kreutzmann, J.; Wilken, R.D.; Falter, R., *Appl. Organometal. Chem.* **13** (1999) 789–794.
52. Ritsema, R.; Donard, O.F.X., *Appl. Organomet. Chem.* **8** (1994) 571–575.
53. Tseng, C.M.; de Diego, A.; Pinaly, H.; Amouroux, D.; Donard, O.F.X., *J. Anal. At. Spectrom.* **13** (1998) 755–764.
54. Stoichev, T.; Rodríguez Martín-Doimeadios, R.C.; Amouroux, D.; Molenat, N.; Donard, O.F.X., *J. Environ. Monit.* **4** (2002) 517–521.
55. Matusiewicz, H.; Kopras, M., *J. Anal. At. Spectrom.* **18** (2003) 1415–1425.
56. Bloom, N., *Can. J. Fish. Aq. Sci.* **46** (1989) 1131–1140.
57. Liang, L.; Horvat, M.; Bloom, N.S., *Talanta* **41** (1994) 371–379.
58. Ceulemans, M.; Adams, F.C., *J. Anal. At. Spectrom.* **11** (1996) 201–206.
59. Cai, Y.; Monsalud, S.; Jaffé, R.; Jones, R.D., *J. Chromatogr A* **876** (2000) 147–155.
60. Demuth, N.; Heumann, K.G., *Anal. Chem.* **73** (2001) 4020–4027.
61. Leenaers, J.; van Moe, W.; Goenaga Infante, H.; Adams, F.C., *J. Anal. At. Spectrom.* **17** (2002) 1492–1497.
62. Rosenkranz, B.; Bettmer, J., *Anal. Bioanal. Chem.* **373** (2002) 461–465.
63. Reuther, R.; Jaeger, L.; Allard, R., *Anal. Chim. Acta* **394** (1999) 259–269.
64. Minagawa, K.; Takizawa, Y.; Kifune, I., *Anal. Chim. Acta* **115** (1980) 103–110.

65. Lansens, P.; Meuleman, C.; Leemarkers, M.; Baeyens, W., *Anal. Chim. Acta* **234** (1990) 417–424.
66. Emteborg, H.; Baxter, D.C.; Frech, W., *Analyst* **118** (1993) 1007–1013.
67. Johansson, M.; Emteborg, H.; Glad, B.; Reinholdsson, F.; Baxter, D.C., *Fresenius J. Anal. Chem.* **351** (1995) 461–466.
68. Bloxham, M.J.; Gachanja, A.; Hill, S.J.; Worsfold, P. J., *J. Anal. At. Spectrom.* **11** (1996) 145–148.
69. Hänström, S.; Briche, C.; Emteborg, H.; Baxter, D.C., *Analyst* **121** (1996) 1657–1663.
70. Blanco, R.M.; Villanueva, M.T.; Uria, J.E.S.; Sanz-Medel, A., *Anal. Chim. Acta* **419** (2000) 137–144.
71. Fernández García, M.; Pereiro García, R.; Bordel García, N.; Sanz-Medel, A., *Talanta* **41** (1994) 1833–1839.
72. Chow, A.; Buksak, D., *Can. J. Chem.* **53** (1975) 1373–1377.
73. Manzoori, J.L.; Sorouraddin, M.H.; Haji Shbani, A.M., *J. Anal. At. Spectrom.* **13** (1998) 305–308.
74. Aizpun, B.; Fernandez, M.L.; Blanco, E.; Sanz-Medel, A., *J. Anal. At. Spectrom.* **9** (1994) 1279–1284.
75. Mondal, B.C.; Das, A.K., *Anal. Chim. Acta* **477** (2003) 73–80.
76. Lee, Y.H.; Mowrer, J., *Anal. Chim. Acta* **221** (1989) 259–268.
77. Mena, M.L.; McLeod, C.W.; Jones, P.; Withers, A.; Mingati, V.; Capelli, R.; Quevauviller, P., *Fresenius J. Anal. Chem.* **351** (1995) 456–460.
78. Cai, Y.; Jaffé, R.; Alli, A.; Jones, R.D., *Anal. Chim. Acta* **334** (1996) 251–259.



- 
79. Celso, V.; Ananth, R.; Scott, S.L.; Lean, D.R.S., *Anal. Chim. Acta* **516** (2004) 171–177.
80. Arthur, C.L.; Pawliszyn, J., *Anal. Chem.* **62** (1990) 2145–2148.
81. Cai, Y.; Bayona, J.M., *J Chromatogr. A* **696** (1995) 113–122.
82. Moens, L.; de Smaele, T.; Dams, R.; van den Broeck, P.; Sandra, P., *Anal. Chem.* **69** (1997) 1604–1611.
83. Dunemann, L.; Hajimiragha, H.; Begerow, J., *Fresenius J. Anal. Chem.* **363** (1999) 466–468.
84. De Smaele, T.; Moens, L.; Dams, R.; Sandra, P.; van der Eycken, J.; Vanduyck, J., *J. Chromatogr A* **793** (1998) 99–106.
85. Carro, A.M.; Neira, I.; Rodil, R.; Lorenzo, R.A., *Chromatographia* **56** (2002) 733–738.
86. Bravo-Sanchez, L.R.; Ruiz Encinar, J.; Fidalgo Martinez, J.I.; Sanz-Medel, A., *Spectrochim. Acta, Part B* **59** (2004) 59–66.
87. He, B.; Jiang, G.B.; Ni, Z.M., *J. Anal. At. Spectrom.* **13** (1998) 1141–1144.
88. Mester, Z.; Lam, J.; Sturgeon, R.; Pawliszyn, J., *J. Anal. At. Spectrom.* **15** (2000) 837–842.
89. Centineo, G.; Blanco Gonzalez, E.; Sanz-Medel, A., *J. Chromatogr. A* **1034** (2004) 191–197.
90. Sarzanini, C.; Sacchero, G.; Aceto, M.; Abollino, O.; Menasti, E., *Anal. Chim. Acta* **284** (1993) 661–667.
91. Falter, R.; Schöler, H.F., *Fresenius J. Anal. Chem.* **353** (1995) 34–38.

92. Cai, Y.; Monsalud, S.; Furton, K.G.; Jaffé, R.; Jones, R.D., *Appl. Organometal. Chem.* **12** (1998) 565–569.
93. Yin, X.; Frech, W.; Hoffmann, E.; Lüdke, C.; Skole, J., *Fresenius J. Anal. Chem.* **361** (1998) 761–766.
94. Liu, W.; Lee, H.K., *J. Chromatogr A* **796** (1998) 385–395.
95. Horvat, M.; Bloom, N.S.; Liang, L.J., *Anal. Chim. Acta* **281** (1993) 135–152.
96. Brito, E.M.S.; Guimaraes, J.R.D., *Appl. Organomet. Chem.* **13** (1999) 487–493.
97. Westöö, G., *Acta Chem. Scand.* **20** (1966) 2131–2137.
98. Westöö, G., *Acta Chem. Scand.* **21** (1967) 1790–1800.
99. Davies, I.M., *Anal. Chim. Acta* **102** (1978) 189–194.
100. Horvat, M.; Byrne, A.R.; May, K., *Talanta* **37** (1990) 207–212.
101. Rapsomanikis, J.; Craig, P.J., *Anal. Chim. Acta* **248** (1991) 563–567.
102. Bulska, E.; Baxter, D.C.; Frech, W., *Anal. Chim. Acta* **249** (1991) 545–554.
103. Orellana–Velado, N.G.; Pereiro, R.; Sanz–Medel, A., *J. Anal. At. Spectrom.* **13** (1998) 905–909.
104. Orellana–Velado, N.G.; Pereiro, R.; Sanz–Medel, A., *J. Anal. At. Spectrom.* **15** (2000) 49–53.
105. Filippelli, M., *Anal. Chem.* **59** (1987) 116–118.
106. Carro–Diaz, A.M.; Lorenzo–Ferreira, R.A.; Cela–Torrijos, R., *J. Chromatogr. A* **683** (1994) 245–252.

- 
107. Watts, J.O.; Boyer, K.W.; Cortez, A.; Elkins, E.R., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **59** (1976) 1226–1233.
108. Hight, S.C.; Capar, S.G., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **66** (1983) 1121–1128.
109. Hight, S.C.; Corcoran, M.T., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **70** (1987) 24–30.
110. Carro-Díaz, A.M.; Lorenzo-Ferreira, R.A.; Cela-Torrijos, R., *J. Chromatogr. A* **730** (1996) 345–351.
111. Alli, A.; Jaffé, R.; Jones, R., *J. High Resolut. Chromatogr.* **17** (1994) 745–748.
112. Qian, J.; Skyllberg, U.; Tu, Q.; Bleam, W.F.; Frech, W., *Fresenius J. Anal. Chem.* **367** (2000) 467–473.
113. Decadt, G.; Baeyens, W.; Bradley, D.; Goeyens, L., *Anal. Chem.* **57** (1985) 2788–2791.
114. Lansens, P.; Baeyens, W., *Anal. Chim. Acta* **228** (1990) 93–99.
115. Jiménez, M.S.; Sturgeon, R.E., *J. Anal. At. Spectrom.* **12** (1997) 597–601.
116. Bloom, N.S., *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **49** (1992) 1010–1017.
117. Harms, U., *Appl. Organomet. Chem.* **8** (1994) 645–648.
118. Liang, L.; Horvat, M.; Cernichiari, E.; Gelein, B.; Balogh, S., *Talanta* **43** (1996) 1883–1888.
119. Palmieri, H.E.L.; Leonel, L.V., *Fresenius J. Anal. Chem.* **366** (2000) 466–469.
120. Yang, L.; Mester, Z.; Sturgeon, R.E., *J. Anal. At. Spectrom.* **18** (2003) 431–436.
121. Filippelli, M., *Appl. Organometal. Chem.* **8** (1994) 687–691.
122. Morrison, M.A.; Weber, J.H., *Appl. Organometal. Chem.* **11** (1997) 761–769.

123. Hintelmann, H.; Evans, R.D.; Villeneuve, J.Y., *J. Anal. At. Spectrom.* **10** (1995) 619–624.
124. Eiden, R.; Falter, R.; Agustin-Castro, B.; Schöler, H.F., *Fresenius J. Anal. Chem.* **357** (1997) 439–441.
125. Hintelmann, H., *Can. J. Anal. Sci. Spectrosc.* **43** (1998) 182–188.
126. Bowles, K.C. ; Apte, S.C., *Anal. Chim. Acta* **419** (2000) 141–151.
127. Lambertsson, L.; Lundberg, E.; Nilsson, M.; Frech, W., *J. Anal. At. Spectrom.* **16** (2001) 1296–1301.
128. Tu, Q.; Qian, J.; Frech, W., *J. Anal. At. Spectrom.* **15** (2000) 1583–1588.
129. Cabañero Ortiz, A.I.; Madrid Albarrán, Y.; Camara Rica, C., *J. Anal. At. Spectrom.* **17** (2002) 1595–1601.
130. Dong, L.M.; Yan, X-P.; Li, Y.; Jiang, Y.; Wang, S-W.; Jiang, D-Q., *J. Chromatogr. A* **1036** (2004) 119–125.
131. Caricchia, A.M.; Minervini, G.; Soldati, P.; Chiavarini, S.; Ubaldi, C.; Morabito, R., *Microchemical Journal* **55** (1997) 44–55.
132. Fisher, R.; Rapsomanikis, S.; Andreae, M.O., *Anal. Chem.* **65** (1993) 763–766.
133. Tu, Q.; Qvarnström, J.; Frech, W., *Analyst* **125** (2000) 705–710.
134. Qvarnström, J.; Frech, W., *J. Anal. At. Spectrom.* **17** (2002) 1486–1491.
135. Grinberg, P.; Campos, R.C.; Mester, Z.; Sturgeon, R.E., *Spectrochim. Acta, Part B* **58** (2003) 427–441.
136. Yan, X.P.; Li, Y.; Jiang, Y., *Anal. Chem.* **75** (2003) 2251–2255.
137. Tseng, C.M.; de Diego, A.; Martin, F.M.; Donard, O.F.X., *J. Anal. At. Spectrom.* **12** (1997) 629–635.

- 
138. Tseng, C.M.; de Diego, A.; Martin, F.M.; Amouroux, D.; Donard, O.F.X., *J. Anal. At. Spectrom.* **12** (1997) 743–750.
139. Rodríguez Pereiro, I.; Wasik, K.; Lobinski, R., *J. Chromatogr. A* **795** (1998) 359–370.
140. Rodríguez Martín-Doimeadios, R.C.; Monperrus, M.; Krupp, E.; Amouroux, D.; Donard, O.F.X., *Anal. Chem.* **75** (2003) 3202–3211.
141. Gebersmann, C.; Heisterkamp, M.; Adams, F.C.; Broekaert, J.A.C., *Anal. Chim. Acta* **350** (1997) 273–285.
142. Rodríguez Pereiro, I.; Wasik, A.; Lobinski, R., *J. Anal. At. Spectrom.* **13** (1998) 743–747.
143. Rodríguez Pereiro, I.; Wasik, A.; Lobinski, R., *Anal. Chem.* **70** (1998) 4063–4069.
144. Slaets, S.; Adams, F.; Rodríguez Pereiro, I.; Lobinski, R., *J. Anal. At. Spectrom.* **14** (1999) 851–857.
145. Rodríguez Martín-Doimeadios, R.C.; Krupp, E.; Amouroux, D.; Donard, O.F.X., *Anal. Chem.* **74** (2002) 2505–2512.
146. Monperrus, M.; Rodríguez Martín-Doimeadios, R.C.; Scancar, J.; Amouroux, D.; Donard, O.F.X., *Anal. Chem.* **75** (2003) 4095–4102.
147. Chen, S.S.; Chou, S.S.; Hwang, D.F., *J. Chromatogr. A* **1024** (2004) 209–215.
148. Jitaru, P.; Goenaga Infante, H.; Adams, F.C., *J. Anal. At. Spectrom.* **19** (2004) 867–875.
149. Vazquez, M.J.; Carro, A.M.; Lorenzo, R.A.; Cela, R., *Anal. Chem.* **69** (1997) 221–225.

150. Vázquez, M.J.; Abuin, M.; Carro, A.M.; Lorenzo, R.A.; Cela, R., *Chemosphere* **39** (1999) 1211–1224.
151. Rio Segade, S.; Tyson, J.F., *Spectrochim. Acta, Part B* **58** (2003) 797–807.
152. Emteborg, H.; Björklund, E.; Ödman, F.; Karlsson, L.; Mathiasson, L.; Frech, W.; Baxter, D.C., *Analyst* **121** (1996) 19–29.
153. Holak, W., *J. AOAC Int.* **78** (1995) 1124–1125.
154. Cela-Torrijos, R.; Miguéns-Rodríguez, M.; Carro-Díaz, A.M.; Lorenzo-Ferreira, R.A., *J. Chromatogr. A* **750** (1996) 191–199.
155. Sun, Y.C.; Minerzwa, J.; Chung, Y-T; Yang, M-H., *Analytical Commun.* **34** (1997) 333–334.
156. Wai, C.M.; Lin, Y.; Brauer, R.; Wang, S.; Beckert, W.F., *Talanta* **40** (1993) 1325–1330.
157. Foy, G.P.; Pacey, G.E., *Talanta* **61** (2003) 849–853.
158. Carro, A.M.; Rubí, E.; Bollain, M.H.; Lorenzo, R.A.; Cela, R., *Appl. Organometal. Chem.* **8** (1994) 665–676.
159. Bettmer, J.; Bradter, M.; Busher, W.; Erber, D.; Rieping, D.; Camman, K., *Appl. Organometal. Chem.* **9** (1995) 541–545.
160. Falter, R.; Ilgen, G., *Fresenius J. Anal. Chem.* **358** (1997) 401–406.
161. Falter, R.; Ilgen, G., *Fresenius J. Anal. Chem.* **358** (1997) 407–410.
162. Wilken, R.D.; Falter, R., *Appl. Organometal. Chem.* **12** (1998) 551–557.
163. Hu, G.; Wang, X., *Analytical Letters* **31** (1998) 1445–1459.
164. Ramalhosa, E.; Rio Segade, S.; Pereira, E.; Vale, C.; Duarte, A., *J. Anal. At. Spectrom.* **16** (2001) 643–647.

- 
165. Tao, G.; Fujikawa, Y.; Mitsui, M.; Yamada, R., *J. Anal. At. Spectrom.* **17** (2002) 560–562.
166. Bache, C.A.; Lisk, D.J., *Anal. Chem.* **43** (1971) 950–952.
167. Zelenko, V.; Kosta, L., *Talanta* **20** (1973) 115–123.
168. Ealy, J.A.; Shults, W.D.; Dean, J.A., *Anal. Chim. Acta* **64** (1973) 235–241.
169. Oda, C.E.; Ingle, J.D., *Anal. Chem.* **53** (1981) 2305–2309.
170. Holak, W., *Analyst* **107** (1982) 1457–1461.
171. Filippelli, M.; Balde, F.; Brinkman, F.E. Olson, G.J., *Environ. Sci. Technol.* **26** (1992) 1457–1460.
172. Bailey, E.; Brooks, A.G.F., *Mikrochim. Acta* **109** (1992) 121–123.
173. Palmisano, F.; Zambonin, P.G.; Cardellicchio, N., *Fresenius J. Anal. Chem.* **346** (1993) 648–652.
174. Medina, I.; Rubi, E.; Mejuto, C.; Cela, R., *Talanta* **40** (1993) 1631–1636.
175. Yess, N.J., *J. Of AOAC Int.* **76** (1993) 36–38.
176. Saouter, E.; Blattman, B., *Anal. Chem.* **66** (1994) 2031–2037.
177. Hardy, S., Jones, P. *J. Chromatogr. A* **791** (1997) 333–338.
178. Abuin, M.; Carro, A.M.; Lorenzo, R.A., *J. Chromatogr. A* **889** (2000) 185–193.
179. Tutschku, S.; Schantz, M.M.; Wise, J.A., *Anal. Chem.* **74** (2002) 4694–4701.
180. Gelaude, I.; Dams, R.; Resano, M.; Vanhaecke, F.; Moens, L., *Anal. Chem.* **74** (2002) 3833–3842.
181. Yang, L.; Colombini, V.; Maxwell, P.; Mester, Z.; Sturgeon, R.E., *J. Chromatogr. A* **1011** (2003) 135–142.

182. Grinberg, P.; Campos, R.C.; Mester, Z.; Sturgeon, R.E., *J. Anal. At. Spectrom.* **18** (2003) 902–909.
183. Weber, J.H., *Trends Anal. Chem.* **16** (1997) 73–78.
184. De Diego, A.; Tseng, C.M.; Stoichev, T.; Amouroux, D.; Donard, O.F.X., *J. Anal. At. Spectrom.* **13** (1998) 623–629.
185. Lückow, Russel, *J. Chromatogr. A* **150** (1978) 187–194.
186. Rodríguez Pereiro, I.; Carro Díaz, A., *Anal. Bioanal. Chem.*, **372** (2002) 74–90.
187. McCormack, A.J.; Tong, S.C.; Cooke, W.D., *Anal. Chem.* **37** (1965) 1470–1476.
188. Huang, C.W.; Jiang, J., *J. Anal. At. Spectrom.* **8** (1993) 681–686.
189. Sarzanni, C.; Sacchero, G.; Aceto, M.; Abollino, O.; Mentasti, E., *J. Chromatogr.* **626** (1992) 151–157.
190. Medina, I.; Rubi, E.; Mejuto, C.; Casais, C.; Cela, R., *Analisis* **21** (1993) 215–218.
191. Carro, A.M.; Lorenzo, R.A.; Cela, R., *LC-GC* **16** (1998) 926–936.
192. Hintelmann, H.; Falter, R.; Ilgen, G.; Evans, R.D., *Fresenius J. Anal. Chem.* **358** (1997) 363–370.
193. Hintelmann, H., *Chemosphere* **39** (1999) 1093–1105.
194. Falter, R., *Chemosphere* **39** (1999) 1051–1073.
195. Falter, R. (Ed.), *Chemosphere* **39** (1999) 1037–1224.
196. Quevauviller, Ph., *Chemosphere* **39** (1999) 1153–1165.



197. Rodríguez Martín-Doimeadios, R.C.; Monperrus, M.; Krupp, E.; Amouroux, D.; Donard, O.F.X., *Anal. Chem.* **75** (2003) 3202–3211.
198. Mizamur Rahman, G.M.; Kingston, H.M., *Anal. Chem.* **76** (2004) 3548–3555.
199. Monperrus, M.; Krupp, E.; Amouroux, D.; Donard, O.F.X.; Martín-Doimeadios, R.C., *Trends Anal. Chem.* **23** (2004) 261–272.



### **I.3. CONTAMINANTES ORGÁNICOS**

#### **I.3.1. INTERÉS MEDIOAMBIENTAL**

La exposición a contaminantes orgánicos es una preocupación de la población general, especialmente el grupo contaminantes orgánicos persistentes (POPs), que está constituido por un grupo heterogéneo de compuestos químicos cuyas características de persistencia en el medio ambiente, acumulación en organismos biológicos y toxicidad hacen de ellos contaminantes prioritarios y por ello son un riesgo medioambiental para seres humanos y ecosistemas. El grupo de contaminantes orgánicos persistentes incluye hidrocarburos aromáticos polinucleares (PAHs), bifenilos policlorados (PCBs), dibenzo-p-dioxinas policloradas (PCDDs) y plaguicidas organoclorados (OCPs). La mayoría de estos compuestos están prohibidos o bien su producción, uso y eliminación están restringidos<sup>1,2</sup>.

Como resultado de estas prohibiciones o restricciones se han buscado alternativas al uso de estos contaminantes orgánicos persistentes, aumentando la producción de otros compuestos, cuya distribución en el medioambiente y toxicidad debe evaluarse antes de que puedan suponer un riesgo medioambiental.

Además de la acumulación más o menos persistente de los contaminantes orgánicos en el medioambiente y del consiguiente aumento de su concentración, estos compuestos pueden dar lugar a interacciones químicas con componentes del medio, con la formación de subproductos que son a veces más tóxicos que los compuestos de partida, por lo que, deben ser también cuidadosamente estudiados<sup>1</sup>.

A continuación, el texto se va a centrar en las familias de contaminantes orgánicos objeto del presente trabajo, entre ellos POPs prohibidos o de uso muy restringido, como plaguicidas organoclorados (OCPs) y bifenilos policlorados (PCBs) y compuestos usados como alternativa de los POPs, éteres de difenilo polibromados (PBDEs), bifenilos polibromados (PBBs) y ésteres de trialkil-/arilfosfato (TAPs).

### **I.3.1.1. IDENTIDAD Y PROPIEDADES**

Es importante conocer la estructura y propiedades de los compuestos, ya que su estabilidad química y biológica y su carácter hidrosoluble o liposoluble van a determinar su distribución en el medioambiente y su posible bioacumulación en los organismos, y, además, su toxicidad va a determinar su efecto sobre dichos organismos<sup>1</sup>.

En general cuanto mayor es el coeficiente de partición octanol/agua ( $k_{ow}$ ), mayor es la probabilidad de que un compuesto químico esté unido a la materia orgánica de suelos y sedimentos, y migre a los tejidos grasos de organismos vivos. Y, cuanto menor sea el valor de la dosis letal ( $LD_{50}$ ) más toxico es el compuesto químico ya que requiere menos cantidad para afectar al animal<sup>3</sup>.

#### **I.3.1.1.1. Plaguicidas Organoclorados (OCPs)**

La definición de plaguicida incluye cualquier compuesto o mezcla de compuestos que se aplique sobre un territorio agrícola para destruir, mantener alejados, prevenir o limitar la acción, en general, de plantas, animales o microorganismos que puedan afectar al desarrollo, rendimiento y conservación de los productos cultivados<sup>4,5,6,7,8,9,10,11</sup>.

Los plaguicidas se suelen clasificar según la acción específica que son capaces de desarrollar sobre los distintos tipos de organismos (herbicidas, insecticidas y fungicidas) o según la estructura o composición química (organofosforados, organohalogenados, compuestos biperidínicos, derivados fenólicos, carbamatos, triazinas, etc.)<sup>1</sup>.

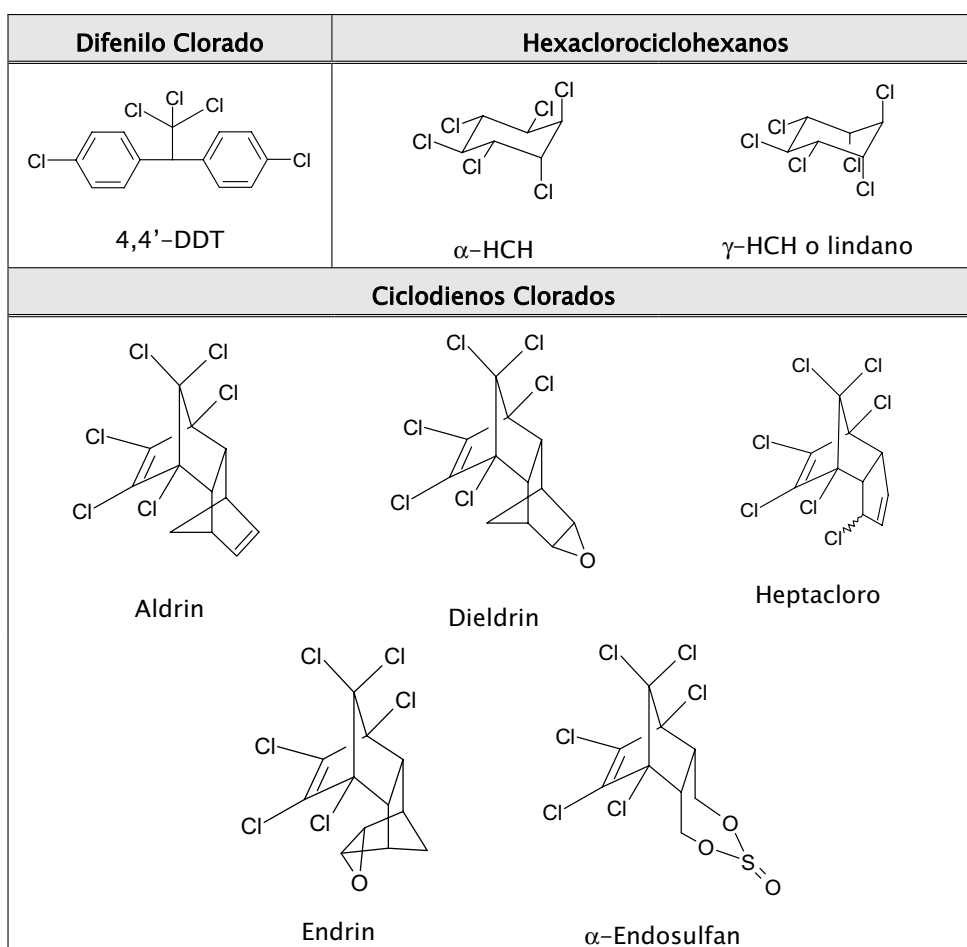


Figura I.3.1. Estructura química de los plaguicidas organoclorados estudiados.

En particular, los plaguicidas organoclorados normalmente son compuestos orgánicos con sustituyentes cloro en varios lugares de su estructura con acción insecticida. Los más conocidos son el para-diclorodifeniltricloroetano (DDT), derivados del hexaclorociclohexano (HCH)

## CONTAMINANTES ORGÁNICOS

y derivados ciclodienicos. Este estudio se centra en 8 plaguicidas organoclorados cuyas estructuras se muestran en la figura I.3.1.

La mayoría de estos plaguicidas organoclorados llegaron al mercado tras la segunda guerra mundial y en los años 50, pero el uso de casi todos estos compuestos a partir de los años 70 ha sido prohibido o muy restringido, debido a su persistencia, toxicidad y su tendencia a acumularse en los tejidos grasos<sup>4</sup>.

Tabla I.3.1. Principales propiedades físicas de los plaguicidas estudiados.

Compuestos	P. Vapor a 25°C <sup>(a)</sup> (Pa)	Solubilidad en agua <sup>(a)</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	Log K <sub>ow</sub> <sup>(a)(b)</sup>	LD <sub>50</sub> oral <sup>(c)</sup> (mg.kg <sup>-1</sup> )
α-HCH	1,05.10 <sup>-1</sup>	8,00	4,26	500-4670
γ-HCH	1,05.10 <sup>-1</sup>	8,00	4,26	60-250
Heptacloro	5,35.10 <sup>-2</sup>	0,18	6,10	40-162
Aldrin	1,61.10 <sup>-2</sup>	0,017	6,50	40-70
Endosulfan	2,32.10 <sup>-5</sup>	0,32	3,83	18-355
Dieldrin	7,88.10 <sup>-4</sup>	0,19	5,40	40-70
Endrin	4,02.10 <sup>-4</sup>	0,25	5,20	3-43
4,4'-DDT	2,14.10 <sup>-5</sup>	0,0055	6,91	80-250

(a) Valores obtenidos en la base de datos Physprop<sup>12</sup>; (b) logaritmo del coeficiente de partición octanol/agua; (c) toxicidad aguda para ratas, valores obtenidos de las monografías correspondientes de WHO<sup>5,6,7,8,9,10,11</sup>.

Los plaguicidas organoclorados son sólidos a temperatura ambiente, y sus principales propiedades (mostradas en la tabla I.3.1) pueden resumirse en los tres puntos siguientes:

- Estabilidad frente a la descomposición o degradación en el medioambiente.
- Baja presión de vapor.

- Solubilidad baja en agua y alta en medios hidrofóbicos como los tejidos grasos en organismos vivos, es decir, marcado carácter liposoluble.

Los plaguicidas organoclorados presentan una gran estabilidad pero bajo ciertas condiciones pueden sufrir una serie de reacciones que originen metabolitos del producto aplicado originalmente. Así, el DDT en presencia de reductores o en ausencia de oxígeno sufre una reacción de eliminación perdiendo HCl y originando diclorodifenildicloroetano (DDE). El aldrin se transforma en dieldrin bajo la acción de la luz solar y con el oxígeno atmosférico o por medio de microorganismos que son capaces de producir reacciones de epoxidación. El endrin origina varios metabolitos entre los que se encuentra el endrin cetona y endrin aldehído. El lindano puede degradarse por la radiación ultravioleta a pentaclorociclohexano y tetraclorociclohexano.

El endosulfan todavía se usa como insecticida en todo el mundo, tanto para aplicaciones domésticas como agrícolas, ya que su bioconcentración y persistencia ambiental es mucho menor que las de los otros plaguicidas organoclorados<sup>1</sup>.

#### **I.3.1.1.2. Bifenilos Policlorados (PCBs)**

Los bifenilos policlorados son hidrocarburos clorados con un núcleo bifenilo donde entre 1 y 10 hidrógenos fueron sustituidos por cloros<sup>13,14,15</sup>. La fórmula química se representa como  $C_{12}H_{10-x-y}Cl_{x+y}$ , donde x e y son el número de átomos de cloro en cada anillo comprendidos entre 1 y 5 (figura I.3.2).

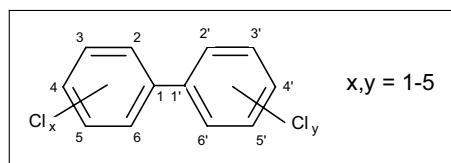


Figura I.3.2. Estructura general de los bifenilos policlorados.

Los PCBs se producen por cloración del bifenilo con cloro molecular en presencia de un catalizador adecuado (normalmente Fe o FeCl<sub>3</sub>), obteniéndose una mezcla de diferentes PCBs individuales. Existen 209 compuestos análogos, que se nombran siguiendo una nomenclatura de la IUPAC en la que a cada congénere se le asigna un número, desde el 1 al 209 según el grado de cloración, como puede verse en la tabla I.3.2.

Tabla I.3.2. Isómeros de los PCBs y su nomenclatura según la IUPAC<sup>15</sup>

Serie	Nº isómeros	Nº IUPAC
Bifenilos monoclororados	3	1-3
Bifenilos diclorados	12	4-15
Bifenilos triclorados	24	16-39
Bifenilos tetraclorados	42	40-81
Bifenilos pentaclorados	46	82-127
Bifenilos hexaclorados	42	128-169
Bifenilos heptaclorados	24	170-193
Bifenilos octaclorados	12	194-205
Bifenilos nonaclorados	3	206-208
Bifenilo decaclorado	1	209

Los PCBs se produjeron comercialmente como mezclas complejas desde 1929 bajo varios nombres de marcas (Acelor, Aroclor, Clophen, etc.) con un contenido promedio de cloro en los diferentes productos comprendido entre 21 y 68 %. Su uso se prohibió en los países industrializados a finales de los 70 debido al impacto ambiental que producían<sup>15</sup>.



Se utilizaron ampliamente como fluidos de refrigeración en transformadores eléctricos y condensadores, como plastificantes, como fluidos de transferencia de calor en máquinas, como agentes impermeables al agua y en otras muchas aplicaciones<sup>16</sup>.

La mayoría de los PCBs son cristales incoloros, aunque las mezclas comerciales son líquidos viscosos y claros. Las propiedades químicas varían mucho según las clases (monoCB-decaCB), pero en general los PCBs presentan:

- Alta estabilidad frente a la descomposición o degradación medioambiental o metabólica.
- Bajas presiones de vapor.
- Bajas solubilidades en agua y altamente solubles en disolventes no polares.

Tabla I.3.3. Principales propiedades físicas de los PCBs estudiados.

Congénera	Nº IUPAC	P. Vapor a 25°C <sup>(a)</sup> (Pa)	Solubilidad en agua <sup>(a)</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	Log K <sub>ow</sub> <sup>(a)(b)</sup>	LD <sub>50</sub> oral <sup>(c)</sup> (mg.kg <sup>-1</sup> )
2,6-dicloroCB	PCB-10	2,54.10 <sup>-2</sup>	2,41	4,98	
2,4,4'-tricloroCB	PCB-28	2,61.10 <sup>-2</sup>	0,27	5,62	
2,2',5,5'-tetracloroCB	PCB-52	1,13.10 <sup>-3</sup>	0,0153	6,09	
2,2',4,4',5,5'-hexacloroCB	PCB-153	4,59.10 <sup>-4</sup>	0,0095	7,15	10
2,2',3,4,4',5'-hexaCB	PCB-138	3,76.10 <sup>-4</sup>	0,0054	7,75	
2,2',3,4,4',5,5'-heptaCB	PCB-180	1,31.10 <sup>-4</sup>	0,0038	8,27	3

(a) Valores obtenidos en la base de datos Physprop<sup>12</sup>; (b) logaritmo del coeficiente de partición octanol/agua; (c) toxicidad aguda para ratas, valores obtenidos de la monografía de la WHO<sup>14</sup>.

## ***CONTAMINANTES ORGÁNICOS***

---

Como puede verse en la tabla I.3.3, donde se muestran las propiedades físicas de los PCBs estudiados, al aumentar el grado de cloración, disminuye la presión de vapor y la solubilidad en agua y aumenta el coeficiente de partición octanol/agua, por lo que van a sufrir una mayor bioacumulación los compuestos más clorados.

Los PCBs son muy resistentes a la degradación química, fotoquímica y biológica, pero su combustión puede producir dibenzofuranos policlorados (PCDFs) que son mucho más tóxicos que los propios PCBs<sup>14</sup>.

La evaluación toxicológica de los PCBs presenta muchos problemas, ya que normalmente se encuentran como mezclas de numerosos compuestos distintos, y muchos datos de su toxicidad se basan en las pruebas de estas mezclas. Obteniendo para mezclas Aroclor 1254 y 1260<sup>14</sup>, con un porcentaje medio de cloro por molécula de 5 y 6-6,3 respectivamente, un LD<sub>50</sub> oral entre 4 y 10 mg.kg<sup>-1</sup>.

Los ensayos realizados con animales revelan que los PCBs más tóxicos son los que no contienen sustituyentes clorados en las posiciones orto respecto a los carbonos que unen los anillos bencénicos, es decir, en las posiciones 2,2',6 y 6', ya que pueden alcanzar una configuración similar a las dibenzo-p-dioxinas policloradas (PCDDs)<sup>15</sup>.

### **I.3.1.1.3. Bifenilos Polibromados (PBBs) y Éteres de Difenilo Polibromados (PBDEs)**

Los bifenilos polibromados (PBBs) y éteres de difenilo polibromados (PBDEs) son grupos de hidrocarburos halogenados formados por la

sustitución de hidrógenos por bromos, con una estructura molecular similar a los PCBs.

Los PBBs responden a la fórmula  $C_{12}H_{10-x-y}Br_{x+y}$ , donde  $x$  e  $y$  son el número de átomos de bromo en cada anillo comprendidos entre 1 y 5, mientras los PBDEs tienen una estructura similar pero con un átomo de oxígeno entre los anillos aromáticos (figura I.3.3)<sup>17,18</sup>.

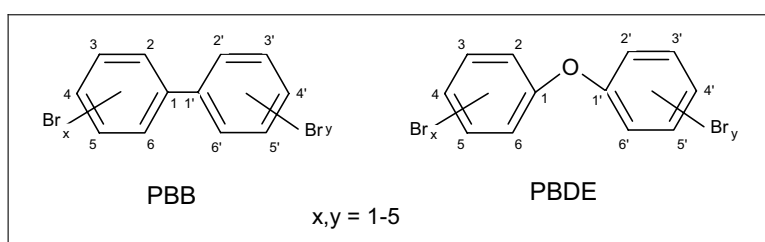


Figura I.3.3. Estructura general de los PBBs y PBDEs.

Por consiguiente existen, teóricamente, 209 congéneres de cada familia, y la numeración es análoga al sistema de la IUPAC de numeración de los PCBs. En la práctica, no todos los congéneres se usan en productos comerciables.

Los PBBs y PBDEs se han fabricado desde principios de los 70 para su uso como pirorretardantes, después de la prohibición de los PCBs.

Los pirorretardantes son un grupo variado de compuestos que se añaden a diferentes materiales como equipamiento eléctrico y electrónico, pinturas, textiles y en coches y aviones por sus propiedades ignífugas. Los pirorretardantes se dividen en aditivos o reactivos. Los reactivos se encuentran enlazados covalentemente al polímero y es menos probable su pérdida al medioambiente, y los aditivos que sólo se mezclan o se disuelven en el material pueden migrar fuera del producto durante su vida útil<sup>19,20</sup>.

## CONTAMINANTES ORGÁNICOS

Hay una amplia variedad de compuestos que se utilizan como pirorretardadores, sinergistas y supresores del humo, como se observa en la figura I.3.4. Desde compuestos inorgánicos (incluyendo compuestos de antimonio, alúmina, estaño y fósforo rojo) hasta complejas moléculas orgánicas (compuestos halogenados, ésteres de fosfato y compuestos nitrogenados) son consumidos a nivel mundial.

La utilización de los pirorretardantes tiene beneficios evidentes, ya que permite salvar del fuego muchas vidas humanas y bienes materiales, pero, en la actualidad se dispone de conocimientos limitados sobre los efectos a largo plazo de la exposición a muchos pirorretardantes y productos de descomposición de los mismos.

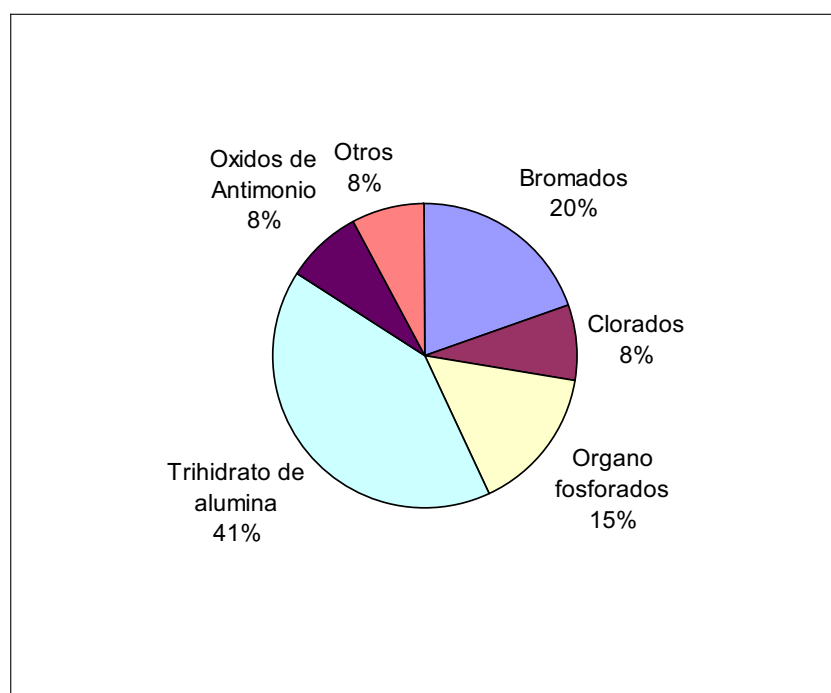


Figura I.3.4. Reparto del consumo mundial de pirorretardantes en el 2001<sup>21</sup>.

Los pirorretardantes bromados, como refleja la figura I.3.4, representan el 20 % de la producción mundial, en los que se engloban

compuestos con diversas estructuras, los más comunes son: bifenilos polibromados (PBBs), éteres de difenilo polibromados (PBDE), tetrabromobisfenol A (TBBPA) y ciclodecano hexabromado (HBCD). Los pirorretardantes bromados representan entre el 10 y el 30 % en peso del polímero<sup>22</sup>.

La producción de PBBs ha cesado en el año 2000 y para los PBDEs la Unión Europea aprobó<sup>23</sup> en 2001 la prohibición de dos formas comerciales en 2003<sup>24</sup> y la tercera en 2006<sup>25</sup>. La prohibición de estos PBDEs llevará en 2006 a un aumento en el consumo de otros tipos de pirorretardantes, incluyendo ésteres organofosforados y compuestos inorgánicos, con nuevos peligros para la salud y/o medioambientales<sup>22</sup>.

Los PBBs que se han fabricado para uso comercial consisten en bifenilos hexa-, octa-, nona- y decabromados, pero también contienen otros productos de la misma familia. Se han usado como aditivo pirorretardante principalmente en plásticos a base de estireno butadieno acrilonitrilo (ABS), para la fabricación de pequeños utensilios y componentes del automóvil, revestimientos, barnices y espumas de poliuretano<sup>17,22</sup>.

Los PBDEs se han producido principalmente como tres mezclas técnicas deca-, octa- y pentaBDE, que se usan normalmente como aditivo pirorretardante en diferentes tipos de polímeros y en numerosos artículos comerciales (tabla I.3.4). La decaBDE, que representa el 75 % del consumo total de PBDEs, se utiliza en numerosos plásticos, sobre todo en el poliestireno de gran resistencia al impacto, en el tratamiento de tejidos utilizados en pasamanería, telas de automóviles y tiendas de campaña. La

## CONTAMINANTES ORGÁNICOS

octaBDE, representa el 15 % del consumo de PBDEs, se utiliza en ABS para la producción de computadores y cabinas comerciales. Y el pentaBDE se utiliza como aditivo de resinas epoxi, resinas fenólicas, poliésteres y poliuretano, así como de materiales textiles<sup>19,22</sup>.

Tabla I.3.4. Composición de las mezclas comerciales de PBDEs<sup>18</sup>.

Producto comercial	Composición (%)							
	Tri	Tetra	Penta	Hexa	Hepta	Octa	Nona	Deca
Penta	0-1	24-38	50-62	4-8				
Octa				10-12	43-44	31-35	9-11	0-1
Deca							0,3-3	97-98

Los PBDEs y PBBs tienen unas propiedades químicas, persistencia y distribución en el medioambiente similares a las de compuestos clorados de estructura similar, como los PCBs.

Tabla I.3.5. Principales propiedades físicas de los PBBs y PBDEs estudiados.

Congénere	Nº IUPAC	P. Vapor a 25°C <sup>(a)</sup> (Pa)	Solubilidad en agua <sup>(a)</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	Log K <sub>ow</sub> <sup>(a)(b)</sup>	LD <sub>50</sub> oral <sup>(c)</sup> (mg.kg <sup>-1</sup> )
4,4'-dibromoBB	PBB-15	7,44.10 <sup>-3</sup>	0,136	5,72	>1000
2,2',4,5'-tetrabromoBB	PBB-49	2,77.10 <sup>-4</sup> (d)		6,75 <sup>(d)</sup>	
2,2',4,4'-tetrabromoBB	PBDE-47	5,61.10 <sup>-4</sup>	0,0093	6,19	
2,2',4,4',5-pentabromoBB	PBDE-99	3,31.10 <sup>-5</sup>	0,0010	6,53	500-5000
2,2',4,4',6-pentabromoBB	PBDE-100	1,28.10 <sup>-4</sup>	0,0012	6,71	

(a) Valores obtenidos en la base de datos Physprop<sup>12</sup>; (b) logaritmo del coeficiente de partición octanol/agua; (c) toxicidad aguda para ratas, valores obtenidos de las monografías correspondientes de la WHO<sup>17,18</sup>; (d) valores calculados con Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software Solares V4.67.

Tal y como se observa en la tabla I.3.5, los PBBs y PBDEs tienen relativamente bajas presiones de vapor a temperatura ambiente. Ésta disminuye al aumentar el número de átomos de bromo. Son prácticamente insolubles en agua, la solubilidad también disminuye al aumentar el número de átomos de bromo y tienen coeficientes de partición octanol/agua altos, por lo que, son solubles en grasas, y entre poco y muy solubles en diversos disolventes orgánicos. Como resultado, son posibles contaminantes medioambientales persistentes<sup>19,25</sup>.

Son compuestos relativamente estables y químicamente inertes, pero las mezclas de alto grado de bromación se fotodegradan, sufren una debromación reductiva al ser expuestas a la radiación ultravioleta. Por ello, los compuestos que se han encontrado en mayor cantidad en el medioambiente y han mostrado mayor toxicidad potencial y bioacumulación son los penta y tetra sustituidos<sup>17,19</sup>.

Además, la combustión de PBBs y PBDEs, puede dar lugar a compuestos altamente tóxicos como dibenzofuranos polibromados y dibenzo-p-dioxinas polibromadas<sup>26</sup>.

#### **I.3.1.1.4. Ésteres Organofosforados (TAPs)**

Los ésteres organofosforados se definen como ésteres del ácido fosfórico donde los hidrógenos fueron sustituidos por grupos arilo o alquilo<sup>27,28,29,30</sup>.

Las estructuras de los compuestos aquí estudiados muestran en la figura I.3.5 y pueden clasificarse según los grupos sustituyentes en:

## CONTAMINANTES ORGÁNICOS

- Trialquilfosfatos: tributilfosfato (TBP), tri(2-butoxietil)fosfato (TBEP), tri(2-etilhexil)fosfato (TEHP)
- Tricloroalquilfosfatos: tri(2-cloroetil)fosfato (TCEP), tri(1-cloro-2-propil)fosfato (TCPP), tri(1,3-dicloro-2-propil)fosfato (TDCP)
- Triarilfosfato: trifenilfosfato (TPhP)
- Bisfosfatos: resorcinol bi(difenilfosfato) (RDP), bisfenol A bi(difenilfosfato) (BDP)

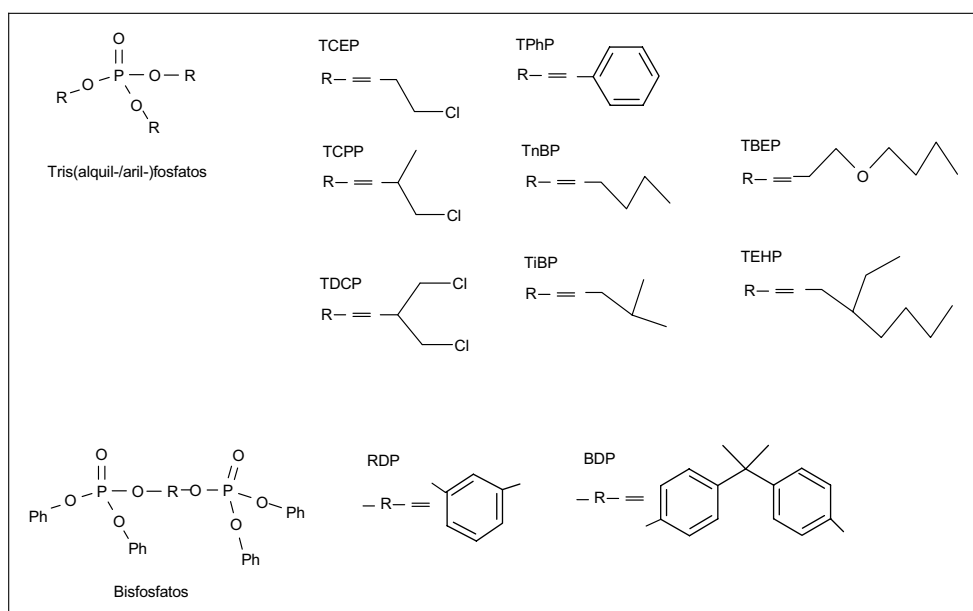


Figura I.3.5. Estructura de los TAPs estudiados.

Los compuestos organofosforados comercializados consisten en un grupo de cerca de 250 compuestos producidos en todo el mundo, aproximadamente 140 de estos compuestos son plaguicidas y el resto se han usado desde los años 40 como pirorretardantes, fluidos hidráulicos y disolventes. Predominantemente, consisten en fosfatos alquilados y arilados<sup>31</sup>.



Estos ésteres de trialquil-/arilfosfato se usan para reemplazar a los PCBs<sup>32</sup>, como pirorretardantes en plásticos y fluidos hidráulicos. En pequeñas cantidades también se usan como lubricantes, adhesivos y revestimientos<sup>33</sup>. Los tri(alquil)fosfatos clorados como TCPP y TDCP se usan principalmente en espumas de poliuretano, mientras los tri(alquil-/aril)fosfatos no clorados, como el TPhP, TBP y TBEP se usan como plastificantes, lubricantes y disolventes<sup>31</sup>.

Además, tras la prohibición en 2006 de algunos pirorretardantes halogenados, se podrán usar otros compuestos no halogenados entre ellos pirorretardantes organofosforados, nitrogenados e inorgánicos como alternativa. El uso de tri(aril)fosfatos y resorcinol bi (difenilfosfato), principalmente en plásticos, llevará a un aumento de su producción, como ya se está notando en el consumo de pirorretardantes en los países del norte de europa<sup>34</sup>.

Los tri(aril-/alquil-) fosfatos difieren mucho en sus propiedades<sup>35</sup> de biodegradabilidad, solubilidad en agua y toxicidad como puede verse en la tabla I.3.6.

En general, los TAPs tienen baja presión de vapor y una solubilidad en agua de baja a moderada y exhiben baja letalidad.

La mayoría de los trialquil-/arilfosfatos se hidrolizan rápidamente en disolución alcalina dando lugar a los correspondientes di(aril-/alquil-)fosfatos, por lo que, también se ha estudiado su posible degradación biológica. Se observó que mientras los tricloroalquilfosfatos presentan baja biodegradabilidad, los triarilfosfatos son fácilmente biodegradados<sup>36</sup>.

## **CONTAMINANTES ORGÁNICOS**

Algunos de los posibles productos de degradación (difencilfosfato) se han identificado en el medioambiente, estos productos son no volátiles y fuertemente polares<sup>27,37</sup>.

Tabla I.3.6. Principales propiedades físicas de los TAPs estudiados.

<b>Compuesto</b>	<b>P. Vapor a 25°C<sup>(a)</sup> (Pa)</b>	<b>Solubilidad en agua<sup>(a)</sup> (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Log K<sub>ow</sub><sup>(a)(b)</sup></b>	<b>LD<sub>50</sub> oral<sup>(c)</sup> (mg.kg<sup>-1</sup>)</b>
TCEP	1,45.10 <sup>-2</sup>	7000	1,44	430-1400
TCPP	2,70.10 <sup>-3</sup>	1200	2,59	1000-4200
TDCP	9,85.10 <sup>-4</sup>	700	3,65	2800
TPhP	8,4.10 <sup>-4</sup>	1,9	4,59	3500-5000
TBP	1,51.10 <sup>-1</sup>	400	4,0	1000-3000
TBEP	3,35.10 <sup>-6</sup>	1100	3,75	3000-4700
TEHP	1,10.10 <sup>-5</sup>	0,6	9,49	10000-37000
RDP	5,03.10 <sup>-11</sup> (d)		5,98 <sup>(d)</sup>	
BDP	1,98.10 <sup>-15</sup> (d)		8,66 <sup>(d)</sup>	> 2000 <sup>(e)</sup>

(a) Valores obtenidos en la base de datos Physprop<sup>12</sup>; (b) logaritmo del coeficiente de partición octanol/agua; (c) toxicidad aguda para ratas, valores obtenidos de las monografías de la WHO<sup>27,28,29,30</sup>; (d) valores calculados con Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software Solares V4.67; (e) Material Safety Data Sheet suministrada por Akzo Nobel.

La biodegradación de tri(aril-/alquil-)fosfatos en el medioambiente es moderada, lo que conduce a que no sean considerados contaminantes persistentes. Los efectos de los ésteres organofosforados y de sus posibles productos de degradación para la salud humana no han sido estudiados en detalle y algunos de ellos están sometidos a valoración de riesgos por la Unión Europea<sup>38</sup>.

### **I.3.1.2. FUENTES Y DISTRIBUCIÓN EN EL MEDIOAMBIENTE**

Los contaminantes orgánicos aquí tratados se han usado en grandes cantidades y se han esparcido intencionadamente (plaguicidas) o han llegado al medio por una manipulación descuidada<sup>1</sup>.

Las fuentes de todos estos contaminantes orgánicos son de origen antropogénico ya que no aparecen de forma natural en el medioambiente. Algunos de estos compuestos, como PCBs y plaguicidas organoclorados, debido a su persistencia en el medioambiente, están prohibidos o su producción y uso está severamente restringida. La principal fuente de exposición al medio ambiente de estos contaminantes ya retirados del uso parece ser su redistribución en el medio.

Tabla I.3.7. Uso de los contaminantes orgánicos estudiados.

Familia	Años de aplicación	Usos
POCs	1950-1980	Lucha contra plagas (insecticidas) Tratamiento de animales contra parásitos Salud Pública (Lucha contra Malaria y Tifus)
PCBs	1920-1975	Fluidos refrigerantes en Transformadores y Condensadores Plastificantes y adhesivos Fluidos lubricantes
PBBs	1970-2000	Pirorretardantes en Espuma de poliuretano, aparatos electrónicos, lacas y plásticos
PBDEs	1960-2006	Pirorretardantes en Aparatos electrónicos e Instalaciones eléctricas, Textiles, Aislantes
TAPs	1960-	Pirorretardantes en componentes eléctricos, plásticos Plastificante Fluidos hidráulicos industriales

Las principales fuentes difusoras han sido las emisiones incontroladas debidas a sus extensas aplicaciones agrícolas o industriales y el incorrecto tratamiento de los residuos llevado a cabo en el pasado, así como los vertidos producidos en accidentes. En la tabla I.3.7 aparecen un resumen de los principales usos de los compuestos estudiados y su período de producción.

## CONTAMINANTES ORGÁNICOS

---

La fuente secundaria de contaminación es la lixiviación y evaporación de la tierra contaminada y vertederos, incineración y combustión, descargas de aguas residuales y lodos<sup>1,4,19</sup>.

Además, los PCBs pueden producirse como co-productos de una gran variedad de procesos químicos que contienen fuentes de cloro e hidrocarburos, durante la cloración de agua y la degradación térmica de otros compuestos orgánicos clorados<sup>16</sup>.

Una vez que estos contaminantes han sido emitidos al medio, se distribuyen, pudiendo ser detectados en aire, agua, suelo, sedimentos, organismos acuáticos y terrestres. La distribución de estos compuestos en el medio ambiente depende de sus propiedades físicas ya mencionadas, como presión de vapor, solubilidad en agua y coeficiente de partición octanol/agua.

En la figura I.3.6 puede verse un esquema de los posibles procesos que pueden sufrir los contaminantes orgánicos en el medio ambiente. La mayoría de los compuestos estudiados son semivolátiles, por lo que, se produce su volatilización del suelo y el agua para pasar a la atmósfera, con el posterior transporte por el aire y la eliminación de la atmósfera mediante deposición o sedimentación húmeda o seca.

En el terreno interactúan con las moléculas produciéndose la adsorción, de ella va a depender la posterior movilización de los compuestos a través de procesos de lavado, volatilización y lixiviación. Así, compuestos con baja solubilidad en agua (POCs, PCBs, PBBs y PBDEs) van a ser difícilmente lavados de los suelos, sobre todo si tienen un alto

contenido en materia orgánica, mientras en general los compuestos con alta solubilidad en agua, van a ser fácilmente lavados y lixiviados de los suelos, llegando al medio acuático.

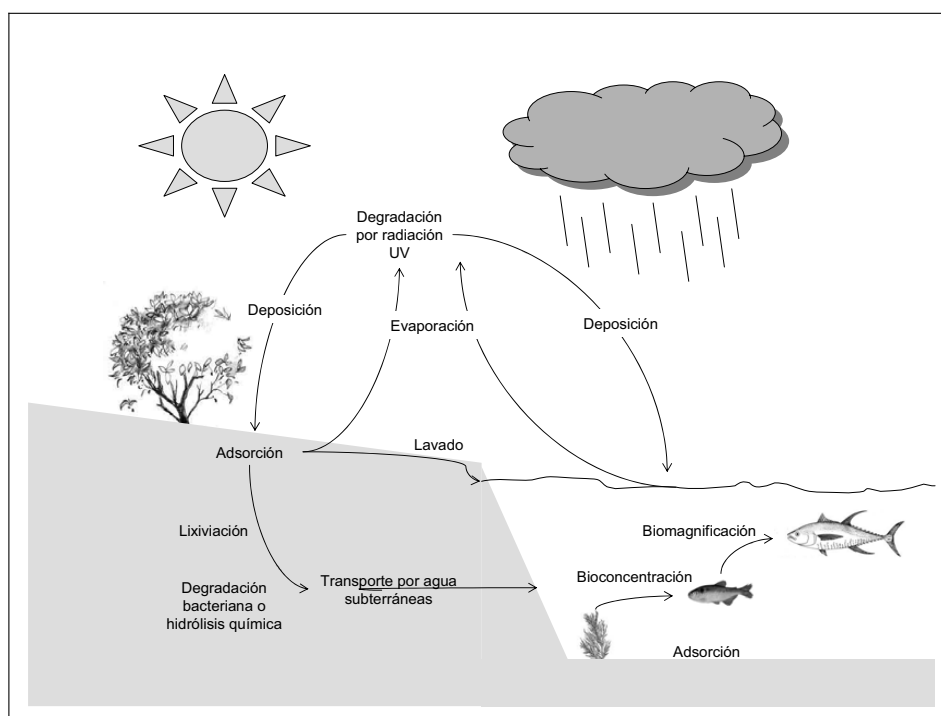


Figura I.3.6. Distribución en el medioambiente de los contaminantes orgánicos.

En el medio acuático, los compuestos con mayor solubilidad en agua (algunos TAPs) van a estar disueltos, mientras los más hidrofóbicos (POCs, PCBs, PBBs y PBDEs) van a interactuar principalmente con la materia en suspensión o con los sedimentos.

A partir de estas fuentes (suelos, agua y sedimentos), estos compuestos entran en organismos vivos, incorporándose a las plantas, y a los animales, por el agua o la alimentación. Produciéndose una bioacumulación de los contaminantes orgánicos más lipofílicos ( $\log k_{ow} > 4$ ) en sistemas biológicos. Sin embargo, cuando el valor de  $\log K_{ow}$  es 8 o mayor entonces existe una elevada adsorción en los sedimentos, de

## CONTAMINANTES ORGÁNICOS

---

manera que no existe suficiente movilidad como para incorporarse al tejido vivo. Así, los compuestos con valores de  $\log K_{ow}$  entre 4 y 8 tienen el mayor grado de bioacumulación<sup>1</sup>, encontrándose en los tejidos a concentraciones que son algunos órdenes de magnitud mayores que los que se encuentran en el medio donde habitan, principalmente en los peces.

Además, muchos de estos compuestos se biomagnifican, es decir, su concentración aumenta a lo largo de la cadena alimenticia como resultado de una secuencia de etapas de bioacumulación<sup>1</sup>.

Para estudiar la persistencia en el medio de estos compuestos hay que tener en cuenta su posible degradación. Así, los contaminantes orgánicos pueden sufrir una serie de reacciones que originan metabolitos del contaminante original, ya sea por la acción de la luz solar o por medio de microorganismos, dando lugar a contaminantes secundarios.

La degradación medioambiental y metabólica de los POCs, PCBs, PBBs y PBDEs es normalmente lenta. A excepción de los PBDEs y PBBs de alto grado de bromación que sufren una debromación fotoquímica dando lugar a compuestos de menor grado de bromación<sup>19</sup>, debido a esto, la distribución de estos compuestos en el medioambiente no corresponde con su producción. Por el contrario, los TAPs no halogenados podrían presentar una degradación moderada, transformándose posiblemente en el correspondiente éster de dialquil-/arilfosfato y en menor cantidad en el monoalquil-/arilfosfato<sup>36,39</sup>.

### **I.3.1.3. BIODISPONIBILIDAD Y TOXICIDAD**

La presencia en el medio ambiente de grandes cantidades de compuestos artificiales y de sus productos de transformación implica un riesgo para la salud humana. Tales compuestos pueden entrar en el organismo a través de la piel o del aparato respiratorio, o bien pueden ser ingeridos cuando se hallan presentes en el agua, en los vegetales o en los animales que constituyen la base de la alimentación, y algunos pueden bioacumularse debido a una alta estabilidad y un alto grado de lipofibilidad.

La principal vía de exposición ocupacional es la inhalación y la absorción cutánea, mientras para la población general es el consumo de comida, particularmente peces y carnes.

En general, estos compuestos en animales y humanos son fácilmente absorbidos a través del tracto intestinal, se absorbe >80 %, o través de los pulmones seguido de la inhalación del vapor, un 50 %. Sin embargo, son poco absorbidos a través de la piel (7-8 %).

Estos compuestos cuando entran en la cadena alimenticia de los animales superiores y, en última instancia, en el organismo humano, se acumulan en algunos órganos vitales y dan lugar al desarrollo de intoxicaciones más o menos graves, por lo que, resulta indispensable evaluar la acción tóxica sobre los distintos organismos.

Los valores de LD<sub>50</sub> oral para los compuestos estudiados están recogidos en las tablas correspondientes del apartado I.3.1.1, siguiendo la escala de Hodge y Sterner (tabla I.3.8) puede concluirse:

## CONTAMINANTES ORGÁNICOS

- Los efectos de los POCs y PCBs presentan una toxicidad entre moderada y alta y sus efectos sobre los animales y los seres humanos han sido ampliamente estudiados.
- Los PBBs y PBDEs son ligeramente tóxicos, y debido a su estructura parecida a los PCBs se supone que los efectos son similares aunque están todavía bajo investigación.
- Los TAPs pueden considerarse ligeramente tóxicos o prácticamente no tóxicos pero actualmente existen pocos estudios sobre sus efectos sobre los seres humanos y la mayoría de los estudios son contradictorios.

Tabla I.3.8. Clasificación de la toxicidad: escala de Hodge y Sterner<sup>3</sup>.

	<b>Niveles de Toxicidad</b>	<b>LD<sub>50</sub> oral, mg.kg<sup>-1</sup></b>
1	Extremadamente Tóxico	≤ 1
2	Altamente Tóxico	1-50
3	Moderadamente Tóxico	50-500
4	Ligeramente Tóxico	500-5000
5	Prácticamente No Tóxico	5000-15000
6	Relativamente inocuo	≥ 15000

Los efectos que presentan para los seres humanos son variados y de diversa consideración según los compuestos considerados, como aparece recogido en la tabla I.3.9.



Tabla I.3.9. Toxicidad de los contaminantes orgánicos estudiados.

Familia	Nivel de Toxicidad	Efectos
POCs	Moderadamente Tóxicos	Disruptores del sistema endocrino Problemas Neurológicos Disfunciones renales y hepáticas Inductores de cáncer
PCBs	Altamente Tóxicos	Disruptores del sistema endocrino Problemas neurológicos Lesiones dérmicas (cloroacné) Disfunciones hepáticas Inductores de cáncer
PBBs	Ligeramente Tóxicos	Disruptores del sistema endocrino Lesiones dérmicas Inductores de cáncer
PBDEs	Ligeramente Tóxicos	Disruptores del sistema endocrino Problemas neurológicos Disfunciones hepáticas Inductores de cáncer
TAPs	Ligeramente a Prácticamente no tóxicos	Problemas neurológicos Dermatitis Inhibidor de colinesterasa eritrocitrica Posibles Inductores de cáncer

### I.3.2. DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES ORGÁNICOS

Las muestras medioambientales y biológicas están normalmente contaminadas con una gran variedad de compuestos. El control del estado de contaminación del ecosistema, la distribución y movimiento de los contaminantes, se basa fundamentalmente en el desarrollo de métodos analíticos sensibles.

## CONTAMINANTES ORGÁNICOS

La determinación de contaminantes medioambientales normalmente comprende tres pasos: extracción, limpieza y separación y detección de los compuestos. Los métodos más usados en cada una de las etapas aparecen recogidos en la figura I.3.7.

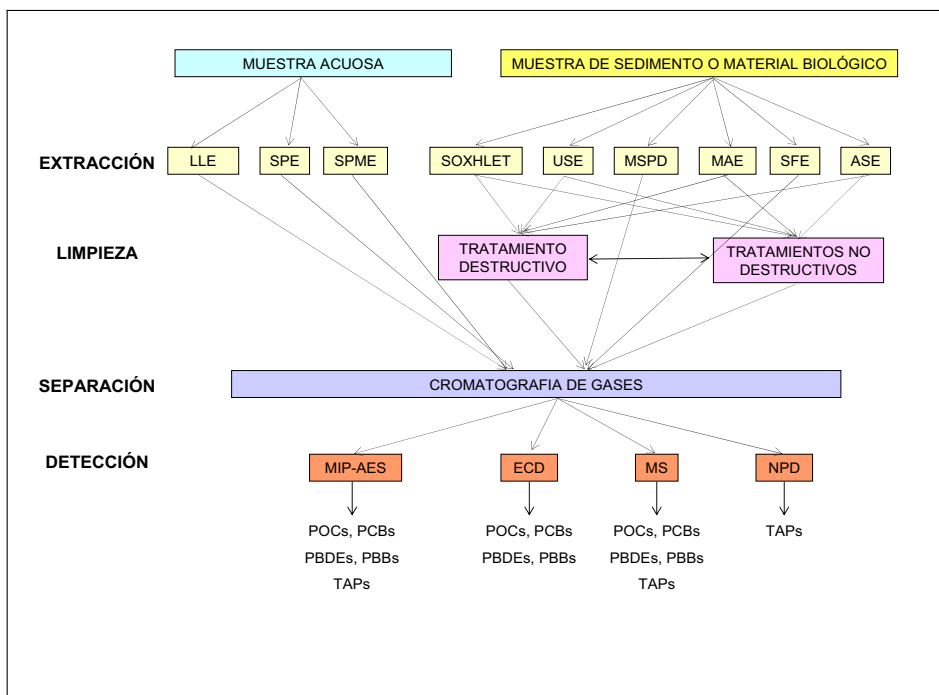


Figura I.3.7. Esquema de los procedimientos de determinación de los contaminantes orgánicos.

La extracción tiene por objeto el aislamiento del analito o del conjunto de analitos estudiados de la matriz compleja original, normalmente incluye una extracción exhaustiva con disolvente. El problema general en el análisis de matrices complejas es que el extracto obtenido por técnicas de extracción exhaustivas contiene normalmente un gran número de componentes de la matriz que podrían coeluir con los analitos y producir problemas en el análisis cuantitativo. La presencia de estas sustancias interferentes demanda una detección muy selectiva o limpieza de los extractos o incluso ambas<sup>40</sup>.

En la limpieza se efectúa la eliminación de las sustancias de la muestra que pueden interferir en el análisis, normalmente se realiza por extracción líquido-líquido, columna de fraccionamiento sólido-líquido basada en la polaridad y/o cromatografía de exclusión por tamaños.

La preparación de muestra es un paso crítico en el ciclo analítico debido a la complejidad de las matrices y a la baja concentración de estos analitos. La mayoría de los métodos de preparación requieren mucho tiempo, son laboriosos y normalmente incluyen el uso de grandes volúmenes de disolventes peligrosos y caros, por lo que se busca la reducción del tiempo de preparación de muestra y de recursos<sup>41</sup>.

#### **I.3.2.1. PREPARACIÓN DE MUESTRAS LÍQUIDAS**

Los métodos de preparación usados históricamente se basan en la extracción líquido-líquido (LLE). En los años 70 se introdujo la extracción en fase sólida (SPE), desde su introducción se desarrollaron nuevos adsorbentes (C18, sílice y fases poliméricas), diferentes diseños (cartucho y discos) y la automatización en el laboratorio. En los años 90 se introdujo la microextracción en fase sólida (SPME), que se basa en el reparto de analitos con una fibra de sílice revestida<sup>42</sup>.

El movimiento físico del agua lleva a la dilución de los contaminantes y esto lleva a la necesidad de desarrollar varios métodos de limpieza y/o preconcentración antes de la separación cromatográfica y detección.

##### **I.3.2.1.1. Extracción Líquido-Líquido (LLE)**

La extracción líquido-líquido se utiliza para la extracción de contaminantes de muestras acuosas. Se basa en la partición de los

## CONTAMINANTES ORGÁNICOS

---

compuestos orgánicos entre la fase acuosa y un disolvente orgánico inmiscible. La eficiencia de la extracción depende de la afinidad de los compuestos por este disolvente, la relación de volúmenes de cada fase y el número de pasos de extracción. Normalmente se utilizan disolventes no polares o débilmente polares. La extracción para compuestos de cierta polaridad podría mejorarse ajustando el pH para prevenir la ionización del compuesto o por formación de pares iónicos o complejos hidrofóbicos<sup>41</sup>.

La configuración más común usa unos 100–200 mL de disolvente orgánico para extraer los contaminantes orgánicos de 1 L de muestra. Como resultado se obtiene un volumen grande que puede concentrarse a unos pocos mililitros usando un evaporador rotatorio o un evaporador Kuderna–Danish o algún otro concentrador<sup>16</sup>.

Los compuestos estudiados en este trabajo se extraen fácilmente mediante disolventes orgánicos apolares o de polaridad intermedia como n-hexano<sup>43</sup> o diclorometano<sup>44,45,46,47</sup> o combinaciones de éstos<sup>48</sup>.

LLE es una técnica con un montaje simple y una manipulación sencilla y cubre un amplio rango de contaminantes y concentraciones, pero es una técnica lenta y laboriosa, requiere grandes cantidades de disolvente que encarece el análisis, produce emulsiones y es difícilmente automatizable.

En los últimos años, se han desarrollado variantes de la extracción líquido-líquido (SLM, LPME, ESy)<sup>41,49,50</sup>, para minimizar el consumo de disolvente y la manipulación de la muestra. La principal aproximación usa una unidad de extracción de membrana miniaturizada, normalmente membranas de PTFE porosas separando las dos disoluciones, combinando

la selectividad y enriquecimiento de LLE con la capacidad de eliminación de constituyentes de la matriz<sup>51,52</sup>.

#### **I.3.2.1.2. Extracción en Fase Sólida (SPE)**

La extracción en fase sólida (SPE) es una técnica de extracción, concentración y limpieza en muestras líquidas, puede usarse directamente como una técnica de extracción para matrices líquidas, o como método de limpieza para extractos de disolventes. La SPE está totalmente aceptada como alternativa en la preparación de muestra mediante LLE<sup>41</sup>.

Esta técnica incluye cuatro pasos<sup>16</sup>:

- Acondicionamiento, las columnas se preparan por activación con un disolvente orgánico y por acondicionamiento con agua,
- Extracción, la fase acuosa se aplica y los analitos se atrapan juntos con interferencias,
- Limpieza, algunas de estas interferencias pueden eliminarse por aplicación de un disolvente de lavado,
- Desorción, la elución de los analitos concentrados se realiza por aplicación de un pequeño volumen de disolvente orgánico, que después se evapora para aumentar el factor de enriquecimiento.

La selección de un adsorbente apropiado de extracción en SPE depende del mecanismo de interacción entre el adsorbente y el analito de interés. La fase sobre la que se adsorben los analitos puede ser<sup>41</sup>:

## CONTAMINANTES ORGÁNICOS

---

- Fase inversa: octadecil- unido a sílice (utilizada para la separación de compuestos no polares hasta débilmente polares), copolímeros de estireno-divinilbenceno o divinilbenceno-n-vinilpirrolidona (compuesto no polares hasta polares) y carbón grafitizado (compuestos no polares hasta muy polares).
- Cambio iónico (compuestos catiónicos y aniónicos).
- Fases selectivas: materiales de acceso restringido (RAM), inmunoadsorbentes y adsorbentes basados en polímeros con impresión molecular (MIP).

Para los compuestos organoclorados y organofosforados estudiados las fases más utilizadas son las de fase inversa, tanto  $C_{18}$ <sup>53,54,55,56,57,58</sup> en cartuchos y en discos, copolímeros de divinilbenceno-n-vinilpirrolidona<sup>59,60,61,62,63,64,65,66,67</sup> (como OASIS HLB) y carbón grafitizado<sup>68,69,70,71</sup>, y en algunos casos resinas como Amberlita XAD-2<sup>33,39,53</sup>. Las fases poliméricas y en mayor medida carbón grafitizado tienen una gama más amplia de retención y dan lugar a extracciones más reproducibles que  $C_{18}$ .

SPE es más ventajosa que LLE debido a la disminución del tiempo de preparación, uso de disolvente, y mejora de la sensibilidad y repetibilidad. La SPE es una técnica simple, rápida, eficiente, barata, fácilmente automatizada y presenta la posibilidad de extracción de compuestos de diferentes polaridades. Sin embargo, podrían aparecer problemas como obturación de la fase y problemas de rotura, para ello es necesaria la

filtración previa de la muestra y el establecimiento de los volúmenes de rotura para cada compuesto.

#### **I.3.2.1.3. Microextracción en Fase Sólida (SPME)**

La microextracción en fase sólida (SPME) se introdujo a principios de los años 90 como un procedimiento rápido y simple de extracción con gran capacidad de concentración, sin la necesidad de disolvente orgánico y con la posibilidad de automatización. Permite la extracción y concentración en un solo paso. Así, ofrece una extracción significativamente más rápida, simple, sencilla y fácilmente automatizable que las técnicas de extracción tradicionales<sup>41</sup>.

Normalmente, la técnica de SPME utiliza una fibra revestida para extraer y concentrar los analitos. SPME consiste en dos pasos separados: en primer lugar una extracción, basada en el reparto de los analitos entre la fase acuosa y el revestimiento orgánico (extracción directa) o entre la fase gas sobre la muestra y la fibra (extracción en espacio de cabeza) y un paso de desorción, después de que la extracción sea completa, la fibra se introduce en el puerto de inyección del GC, los analitos son desorbidos térmicamente en 1–20 min. Esta técnica elimina completamente el uso de disolventes orgánicos.

El desarrollo de un procedimiento mediante SPME requiere normalmente la optimización de las variables relacionadas con los pasos de extracción (tipo de fibra; tiempo de extracción: 30 s – 120 min; fuerza iónica: 0% – saturación NaCl; pH 2–11; temperatura: 4–100°C; efectos de matriz; volumen de muestra: 1–150 mL; posición de la fibra; agitación: 0–

## CONTAMINANTES ORGÁNICOS

---

1600 rpm) y desorción (temperatura: 140–310°C; tiempo de desorción: 1–20 min)<sup>42</sup>.

La SPME se aplicó a la determinación de los contaminantes estudiados en este trabajo en muestras líquidas usando principalmente la fibra de polidimetilsiloxano (PDMS)<sup>72,73,74,75,76,77,78</sup>, aunque también existen algunos estudios con poliacrilato (PA)<sup>79,80,81</sup>, polidimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS/DVB)<sup>82,83,84</sup> para la extracción de OCPs. En los últimos años una nueva fibra de divinilbenceno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS)<sup>56,85</sup> se ha utilizado para la extracción de OCPs.

También se ha aplicado como técnica de preconcentración tras el paso de extracción de compuestos organoclorados de una muestra sólida<sup>86,87</sup>.

Para corregir la influencia de la matriz en la eficiencia de SPME se requiere el uso de patrón interno y/o método de adición estándar. Es importante tener en cuenta, que para que el patrón interno funcione bien en SPME su coeficiente de partición entre la muestra y el revestimiento de la fibra debe ser similar a los de los analitos objetivo, y esto se podría conseguir con análogos marcados isotópicamente pero que resultan caros y no siempre están comercialmente disponibles<sup>86</sup>.

Una variación de esta técnica es la extracción con barra adsorbente<sup>88</sup> (SBSE) que se ha usado para la extracción de PCBs. En esta técnica la fase estacionaria recubre una barra magnética, usa un mayor espesor de fase que la SPME y por lo tanto presenta mayor capacidad. Después del paso de concentración, los analitos se desorben térmicamente de la barra agitadora on-line con el cromatógrafo de gases.



Los métodos de extracción de los compuestos organohalogenados y organofosforados en muestras líquidas aparecen resumidos en la tabla I.3.10.

Tabla I.3.10. Resumen de métodos de determinación de los compuestos orgánicos estudiados en agua.

Año	Preparación de muestra	Separación/ Detección	Obs.	Ref.
1981	SPE: XAD-2; elución con DCM	GC-NPD	TAPs	33
1983	SPE: XAD-2; elución con acetona; derivatización diazobutano	GC-FID	DAPs, LOD: 0,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (1 L)	39
1985	LLE: con DCM	GC-FPD o MS	TAPs, LOD: 5-20 $\text{ng.L}^{-1}$ (3 L)	44
1988	LLE: con DCM	GC-ECD	OCPs, LOD: 0,02-0,09 $\mu\text{g.L}^{-1}$ PCBs, LOD: 0,5-0,9 $\mu\text{g.L}^{-1}$	45
1998	SPME: PDMS 30 min 100°C		PCBs, LOD: 0,3-1 $\text{ng.L}^{-1}$	76
1999	LLE: con DCM	GC-FPD	TAPs	46
1999	SPE: RP-C18, elución con acetona o agua:acetonitrilo	GC-MS	TAPs	54
1999	SPE: GCB, elución DCM:metanol	GC-MIP-AES	OCPs, LOD: 3-80 $\text{ng.mL}^{-1}$	69
1999	SPME: PA 45 min 60-100°C	GC-ECD	OCPs, LOD: 0,15-0,30 $\text{ng.L}^{-1}$	81
2000	SPE: C18; eluyente acetonitrilo:DCM	GC-ECD GC-MS	OCPs, LOD: 2-26 $\text{ng.L}^{-1}$	55
2000	SPE: OASIS; eluyente acetonitrilo:DCM	GC-MS	OCPs, PCBs	59
2000	SPME: PDMS 55°C 30 min	GC-ECD	OCPs, LOD: 0,1 $\text{ng.mL}^{-1}$	77
2000	SPME: PA 100°C 40 min	GC-ECD	OCPs, PCBs; LOD: 0,06-3,4 $\text{ng.mL}^{-1}$	80

## CONTAMINANTES ORGÁNICOS

Tabla I.3.10. Resumen de métodos de determinación de los compuestos orgánicos estudiados en agua.

Año	Preparación de muestra	Separación/ Detección	Obs.	Ref.
2001	SPE: Bond Elut PPL, eluyente acetonitrilo:metanol	GC-MS	TAPs, LOD: 1 ng.L <sup>-1</sup>	31
2001	LPME: 50°C 25 min, con hexano	GC-ECD	OCPs, LOD: 0,05 ng.mL <sup>-1</sup>	49
2001	SPE: estireno-DVB, eluyente acetato de etilo	GC-MS	TAPs, LOD: 0,1-0,7 ng.L <sup>-1</sup>	61
2002	LLE: disolvente hexano:DCM	GC-ECD	OCPs, LOD: 0,01-0,2 ng.mL <sup>-1</sup>	48
2002	SPE: C18, eluyente hexano	GC-ECD	OCPs, LOD: 0,02 ng.mL <sup>-1</sup>	56
2002	SPME: DVB/CAR/PDMS, 30 min 22°C	GC-ECD	OCPs, LOD: 0,05 ng.mL <sup>-1</sup>	56
2002	SPE: OASIS, eluyente tolueno	GC-μECD	OCPs, LOD: 0,01-0,3 ng.mL <sup>-1</sup>	62
2002	SPME: PDMS 50 min 50°C	GC-MS	PCBs, LOD: 0,03-0,11 ng.mL <sup>-1</sup>	72
2002	SPME: PDMS 45 min	GC-ECD	OCPs	74
2002	SPME: PDMS/DVB	GC-ECD	OCPs, LOD: 1-10 ng.mL <sup>-1</sup>	82
2002	SPME: DVB/CAR/PDMS 30 min	GC-ECD	OCPs, LOD : 0,5-7,4 ng.L <sup>-1</sup>	85
2003	LLE: disolvente DCM	GC-ECD	OCPs, LOD: 5,5-20,6 ng.L <sup>-1</sup>	47
2003	MMLLE	GC-NPD	TAPs, LOD : 0,2-0,9 ng.mL <sup>-1</sup>	51
2003	SPE : cartuchos C18, eluyente MTBE	GC-MS	OCPs, PCBs; LOD: 0,05-0,5 ng.mL <sup>-1</sup>	57
2003	SPE : OASIS HLB, eluyente DCM :metanol	GC-MS	OCPs, PCBs; LOD: 2-80 pg.g <sup>-1</sup>	63
2003	SPE : OASIS HLB, eluyente metanol :MTBE	LC-MS	TAPs	64
2004	MMLLE	GC-MS	OCPs, LOD: 0,05-2,3 ng.mL <sup>-1</sup>	52
2004	SPE: discos C18	GC-ECD	PCBs	58

Tabla I.3.10. Resumen de métodos de determinación de los compuestos orgánicos estudiados en agua.

Año	Preparación de muestra	Separación/ Detección	Obs.	Ref.
2004	SPE: DVB (Speedisks), eluyentes MTBE y tolueno	GC-MS	TAPs, LOD: 1–7 ng.L <sup>-1</sup>	65
2004	SPME: PDMS 100°C 30 min	GC-MS	PBDEs, LOD : 20–190 pg.L <sup>-1</sup> PBBs, LOD : 7–9 pg.L <sup>-1</sup>	73
2004	SPME : PA 40 min		OCPs	79

### I.3.2.2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS SÓLIDAS

Las técnicas más antiguas usadas en la extracción sólido-líquido incluyen Soxhlet y agitación. Estos métodos se han usado con una gran variedad de combinaciones de disolventes y aditivos. En los últimos años, la extracción tradicional Soxhlet (SOX) se ha reemplazado por algunas técnicas de extracción más rápidas, incluyendo extracción con ultrasonidos (USE), dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD), extracción asistida por microondas (MAE), extracción con fluidos supercríticos (SFE) y extracción acelerada con disolventes (ASE). Estas técnicas alternativas reducen considerablemente el consumo de disolvente y simplifican el procedimiento de extracción.

Los métodos usados en la extracción de sedimentos, suelos y tejidos biológicos dependerán de la naturaleza lipofílica de la matriz<sup>41</sup>.

#### I.3.2.2.1. Extracción Soxhlet (SOX)

La extracción Soxhlet (SOX) es una de las técnicas de extracción sólido-líquido más usadas, se desarrolló a finales del siglo diecinueve, se

## CONTAMINANTES ORGÁNICOS

---

usa un disolvente orgánico (hexano, acetona, diclorometano o metanol) para la extracción de contaminantes orgánicos no polares o semipolares en matrices sólidas<sup>41</sup>.

Después de la homogeneización de la muestra con sulfato sódico, para eliminar el agua presente en la muestra se deja entre 6–24 horas. A continuación, el polvo seco se pone a reflujo con el disolvente. El tamaño del sistema puede variar, pero la mayoría de las configuraciones usa alrededor de 100–200 mL de disolvente y 5–50 g de muestra sólida, con extracciones que llevan de 4 a 18 horas. Como resultado se obtiene un volumen grande de extracto que debe concentrarse y en muchas ocasiones someterse a una etapa adicional de limpieza<sup>16,89,90</sup>.

La extracción de OCPs, PCBs y PBDEs con Soxhlet se puede llevar a cabo con un disolvente como diclorometano<sup>47,91</sup> o hexano<sup>92</sup> aunque para la extracción exhaustiva de los compuestos en la mayoría de los casos es necesario el uso de mezcla de disolventes polares y no polares como acetona/hexano<sup>86,93,94,95,96,97,98,99,100,101,102</sup>.

Soxhlet es una técnica simple y sencilla de implantar y usar, con una inversión inicial baja y no requiere una posterior filtración. Sin embargo, entre sus desventajas están que requiere grandes volúmenes de disolventes, largo tiempo de extracción como resultado de la lenta difusión de los analitos, generación de extractos con interferencia que requieren etapas de limpieza, dilución de los analitos que hace necesaria una posterior concentración de los extractos y no puede ser totalmente automatizable.

Para superar algunas de las desventajas de la extracción Soxhlet convencional se han desarrollado las extracciones Soxtec o Soxtherm<sup>103,104</sup> y Soxhlet asistida por microondas<sup>105,106</sup>, reduciendo el tiempo y el volumen de disolvente usado<sup>41</sup>.

#### **1.3.2.2.2. Extracción Asistida por Ultrasonidos (USE)**

La extracción asistida por ultrasonidos (USE) es una técnica de extracción simple en la que la muestra se sumerge en un disolvente orgánico apropiado en un recipiente y se coloca en un baño de ultrasonidos, tras la extracción la mezcla de la muestra y disolvente orgánico se separa por filtración y posteriormente se lava la muestra con disolvente. USE ha demostrado ser un camino efectivo de extracción de un gran número de analitos orgánicos e inorgánicos de diferentes tipos de muestras sólidas<sup>41</sup>.

La eficiencia de extracción depende de la polaridad del disolvente, la homogeneidad de la matriz y el tiempo de ultrasonicación. La USE es una técnica que requiere 30–200 mL de disolvente, 1–30 g de muestra y un tiempo de extracción de 10–60 minutos.

En muchos casos, la extracción asistida por ultrasonidos es una alternativa eficiente frente a otras técnicas de extracción<sup>98,102,103,107,108</sup> para la lixiviación de los compuestos organoclorados estudiados. Es una técnica barata, sencilla y no requiere instrumentos caros. Sin embargo, requiere un gran volumen de disolvente, podría requerir extracciones sucesivas, el método no está automatizado y es necesario un paso de limpieza. Se obtienen precisiones más bajas debido a que normalmente en el baño de

ultrasonidos la distribución de la energía no es uniforme<sup>109</sup>. La ultrasonificación fue aceptada como alternativa al Soxhlet, con menor tiempo de extracción, pero las condiciones de extracción tienen que ser cuidadosamente optimizadas para obtener eficiencias de extracción satisfactorias.

### **I.3.2.2.3. Dispersión de la Matriz en Fase Sólida (MSPD)**

La dispersión de la matriz en fase sólida<sup>110</sup> (MSPD) es una técnica de extracción y limpieza, introducida en 1989, que se basa en la dispersión de la muestra sobre un adsorbente generalmente Florisil<sup>111,112</sup> o C<sub>18</sub><sup>113,114,115,116</sup>.

En MSPD, una pequeña cantidad de muestra se homogeniza y dispersa en un soporte sólido. La matriz homogeneizada se coloca en una columna, potencialmente multifásica, y los analitos se eluyen con un disolvente orgánico. Así, se lleva a cabo la extracción y limpieza en un mismo paso. Normalmente la fase que se coloca debajo de la muestra está formada por un adsorbente como gel de sílice<sup>115</sup> o florisil<sup>111,112,113,114,116</sup>, que retienen los compuestos interferentes en muestras, principalmente, con alto contenido lipídico<sup>117</sup>.

Ling y Huang<sup>115</sup> compararon el uso de diferentes adsorbente para la extracción de contaminantes clorados mediante MSPD, como florisil, gel de sílice acidificado y alúmina neutra, obteniendo los mejores resultados mediante la utilización de florisil.

El procedimiento MSPD en comparación con las técnicas de extracción clásicas (Soxhlet) requiere menor tamaño de muestra (0,5 vs 25 g), menor

tiempo de análisis (40 min vs 300 min) y menor volumen de disolvente (10 mL vs 100 mL de disolvente)<sup>115</sup>.

#### **I.3.2.2.4. Extracción Asistida por Microondas (MAE)**

La extracción asistida por microondas<sup>118,119</sup> (MAE) es una técnica aplicada a partir de los años 80, consiste en la suspensión de las muestras en disolventes orgánicos y su irradiación con energía microondas, permite una extracción rápida de solutos desde la matriz sólida con una eficiencia de extracción comparable a la de las técnicas clásicas. Es necesario un paso de filtración y limpieza después de la extracción. La aplicación de la energía a la muestra se puede realizar de dos maneras, en vasos cerrados bajo control de presión y temperatura o en vasos abiertos a presión atmosférica.

La extracción asistida por microondas presurizada (MAE) permite una rápida extracción (10–30 min) con bajo consumo de disolvente (20–30 mL) para tamaños de muestra pequeños (1–10 g), y hasta una extracción simultánea de 12 muestras con un coste inicial del equipamiento medio. Las principales desventajas son la necesidad de limpieza, el largo tiempo de enfriamiento de las celdas de extracción y la necesidad de que el disolvente absorba energía de microondas.

Como en las otras técnicas de extracción sólido-líquido la principal mezcla de disolventes que se utiliza para la extracción de OCPs y PCBs es hexano/acetona<sup>98,102,103,120,121,122,123</sup>. Aunque el hexano no absorbe radiación de microondas, la acetona sí lo hace permitiendo así el calentamiento de la muestra, normalmente en torno a los 115°C<sup>47,124</sup>. El

mismo efecto puede conseguirse con la mezcla hexano:DCM para la extracción de TAPs<sup>32</sup>.

Esta técnica de MAE se ha comparado con la extracción Soxhlet obteniendo resultados similares<sup>47,102,103,98,122,123</sup>, con las considerables ventajas de menor consumo de disolventes y tiempo que MAE supone.

López-Ávila y col.<sup>103</sup> compararon la extracción asistida con microondas con otras técnicas de extracción como Soxtec y USE para la extracción de POCs, obteniendo mejores recuperaciones con el uso de MAE y en un tiempo más corto de preparación de muestra.

#### **I.3.2.2.5. Extracción con Fluidos Supercríticos (SFE)**

La extracción con fluidos supercríticos (SFE) ha recibido una gran atención en los últimos 20 años para la extracción de muestras sólidas o semisólidas. Consiste en la extracción de los analitos con un fluido supercrítico que tiene densidades similares a líquidos, pero con viscosidades más bajas y coeficientes de difusión más altos, lo que hace que sean fluidos más penetrantes, con mayor poder de solvatación y mayor velocidad de extracción de solutos. Además, combinando la extracción SFE con trampas de adsorbentes sólidos y su posterior elución con disolventes orgánicos, se obtiene en un simple paso la extracción y limpieza. El fluido supercrítico más usado es el CO<sub>2</sub> debido a su adecuada temperatura crítica (31,2°C) y presión (72,8 atm).

La extracción con fluidos supercríticos se ha usado ampliamente para los compuestos organoclorados estudiados<sup>93,94,125,126,127,128,129,130</sup>. Además, debido a la presencia de posibles sustancias que se coextraigan con los



compuestos de interés, se han estudiado mejoras en la etapa de limpieza de los extractos antes de su inyección directa en el sistema cromatográfico. La introducción en la celda de un adsorbente de compuestos de naturaleza lipídica (como alúmina<sup>131,132,133</sup>, florisil<sup>134,135,136</sup> y gel de sílice<sup>137</sup>) o de azufre (como cobre<sup>138,139</sup>), ha simplificado la extracción de estos analitos.

Los resultados se han comparado con otras técnicas de extracción, como Soxhlet, obteniendo resultados similares y en algunos casos mejores para los OCPs y PCBs estudiados<sup>93,94,125,128,129,130</sup>.

La extracción con fluidos supercríticos es un método rápido (10–60 min), simple, totalmente automatizable, donde se obtiene extractos limpios, con un bajo consumo de disolventes (2–5 mL) y de muestra (1–5 g) y un alto grado de selectividad. Pero una desventaja importante es el gran número de variables a controlar, por lo que el desarrollo y la validación de los métodos de SFE puede ser costoso y largo. Además hay que tener en cuenta la gran inversión inicial del equipo automatizado.

#### **I.3.2.2.6. Extracción Acelerada con Disolventes (ASE)**

La extracción acelerada con disolventes (ASE) se introdujo en 1995, en sus diferentes variantes como extracción con fluidos presurizados (PFE) o extracción con líquido a presión (PLE), y se basa en la extracción de una muestra sólida con un disolvente bajo condiciones de presión y temperatura elevadas (50–200 °C y 50–2000 Pa).

La extracción se realiza incluyendo los siguientes pasos: colocación de la muestra en la celda de extracción, llenado de la celda con un disolvente, calentamiento y presurización de la celda a los valores marcados (paso de

## CONTAMINANTES ORGÁNICOS

---

pre-extracción), extracción de la muestra durante un cierto tiempo (paso de extracción estática), transferencia del disolvente a un vial, limpieza de la muestra con disolvente nuevo y purga del residuo de disolvente de la muestra con un gas.

Esta técnica de extracción se ha utilizado en la extracción de PCBs y PBDEs de muestras biológicas y sedimentos usando, como en la mayoría de las técnicas de extracción sólido-líquido mezclas de disolventes como hexano/acetona<sup>98,102,140,141,142</sup> o hexano/diclorometano<sup>40,143</sup>, obteniendo resultados comparables con las otras técnicas<sup>98,102,145,142,146</sup>. Como en la SFE se ha intentado obtener extractos más limpios introduciendo adsorbentes en la celda de extracción<sup>40,144,145,146</sup>.

ASE tiene varias ventajas sobre la extracción convencional con Soxhlet, estas ventajas incluyen reducción de consumo de disolvente (10–100 mL), disminución de tiempo de extracción (5–30 min) y la posibilidad de automatización. Las desventajas de este método incluyen el alto coste del equipamiento, elevada temperatura que podría degradar los analitos termolábiles y posible bloqueo a través de la concentración de materiales de la matriz.

Se han realizado varios estudios de comparación de técnicas de extracción<sup>98,102,145,147</sup>, aplicadas principalmente a la separación de contaminantes organoclorados, en muestras sólidas, obteniendo mayores eficiencias con ASE, MAE y SFE que con Soxhlet, mientras USE presenta menores eficiencias y mayores problemas de reproducibilidad.

En la tabla I.3.11 aparece recogida la evolución de los métodos de determinación de los compuestos orgánicos estudiados en sedimentos.

Tabla I.3.11. Resumen de métodos de determinación de los compuestos orgánicos estudiados en muestras de sedimentos.

Año	Preparación de muestra	Limpieza	Separación/ Detección	Obs.	Ref.
1985	LSE: con DCM	columna de Florisil	GC-FPD o MS	TAPs, LOD: 5-20 ng.L <sup>-1</sup>	44
1988	USE: con hexano:acetona	tratamiento con tetrabutilammonio	GC-ECD	OCPs, LOD: 1-6 ng.g <sup>-1</sup> PCBs, LOD: 60-70 ng.g <sup>-1</sup>	45
1992	SFE: 50°C, 20 MPa, 10 min estática + 20 min dinámica ; eluyente isooctano		GC-ECD	PCBs, OCPs	125
1993	SFE: 20°C, 650 atm, 40 min dinámica, eluyente acetona		GC-ECD	PCBs	126
1994	MAE: 15 min, 100 % potencia, Disolvente: hexano/DCM		SFC-TID	TAPs, LOD: 100-200 ng.g <sup>-1</sup>	32
1994	SFE: 60°C, 218 bar, limpieza con Cu, 20 min estática, 40 min dinámica, eluyente heptano: DCM		GC-ECD	PCBs, LOD: 1-2 ng.g <sup>-1</sup>	94
1994	MAE: 10 min, 115 °C, 50% potencia, Disolvente hexano:acetona		GC-MS	OCPs	103
1995	MAE: 10 min, 115 °C, 100% potencia. Disolvente hexano:acetona		GC-ECD	PCBs	120
1995	MAE: 10 min, 115°C, 100% potencia, Disolvente hexano:acetona	Filtración por lana de vidrio	GC-ECD	OCPs	121

## CONTAMINANTES ORGÁNICOS

Tabla I.3.11. Resumen de métodos de determinación de los compuestos orgánicos estudiados en muestras de sedimentos.

Año	Preparación de muestra	Limpieza	Separación/ Detección	Obs.	Ref.
1996	SFE: 100°C, 200 atm, 30 min dinámica eluyente hexano		GC-ECD	PCBs	129
1996	ASE: 100°C 2000 psi, 5 min estática, disolvente hexano : acetona	Columna de nitrato de plata y gel de sílice acidificada	GC-ECD	PCBs	140
1997	SFE: 120°C 374 bar, limpieza con polvo de cobre, 20 min estática, 40 min dinámica, eluyente heptano:acetato de etilo		GC-ECD	PBDEs, PBBs PCBs, OCPs LOD: 10 pg.g <sup>-1</sup>	138
1997	ASE: 100°C 2000 psi, 5 min estática, 5 min dinámica, eluyente acetonitrilo		GC-ECD	PCBs	141
1998	SLE: con acetona y hexano:acetona	tratamiento con tetrabutilamo nio	GC-MS	PBDEs	155
1999	Soxhlet: hexano:acetona 4h	Columna alúmina	GC-ECD	PBDEs	95
1999	SFE: 50-80°C 300 bar, limpieza con polvo de cobre, 10-20min estática, 30-40 min dinámica, eluyente heptano	Columna multicapas	GC-MS	PCBs, OCPs	139
2003	PLE: adsorbente alúmina, cobre, 100°C 1500psi, 10 minx2 ciclos, disolvente hexano:DCM		GC-MS	PBDEs	40
2003	MAE: disolvente DCM, 6 min, 100%	Columna de gel de sílice	GC-ECD	OCPs, LOD: 0,6- 2,1 ng.g <sup>-1</sup>	47

Tabla I.3.11. Resumen de métodos de determinación de los compuestos orgánicos estudiados en muestras de sedimentos.

Año	Preparación de muestra	Limpieza	Separación/ Detección	Obs.	Ref.
2003	MAE: disolvente hexano:acetona, 100°C 90s 150W		GC-MS	PCBs, LOD: 28 ng.g <sup>-1</sup>	106
2004	MAE: disolvente hexano:acetona, 15 min 115°C	Columna de cobre activado	GC-ECD GC-MS	PCBs, LOD: 1,5 ng.g <sup>-1</sup>	122
2004	MAE: disolvente hexano:acetona, 130°C 10min	Tratamiento con cobre y cartucho de sílice	GC-MS	PCBs, OCPs	123

En la tabla I.3.12 aparece recogido el desarrollo de los métodos de determinación de los compuestos orgánicos objeto de este estudio en muestras de material biológico.

Tabla I.3.12. Resumen de métodos de determinación de los compuestos orgánicos estudiados en muestras de material biológico.

Año	Preparación de muestra	Limpieza	Separación/ Detección	Obs.	Ref.
1987	LSE: con hexano-acetona	tratamiento con ácido sulfúrico; columna de Florisil	GC-ECD o MS	PBBs	154
1991	MSPD: dispersión en C18; Adsorbente Florisil; Eluyente Acetonitrilo		GC-ECD	OCPs, LOD: 10 ng.g <sup>-1</sup>	113
1993	MSPD: dispersión en C18; Adsorbente Florisil; Eluyente Acetonitrilo		GC-ECD	OCPs	114
1994	SFE: 60°C, 218 bar, 10 min estática, 30 min dinámica. Eluyente Heptano	Columna de sílice acidificada	GC-ECD	PCBs, LOD: 0,5-2 ng.g <sup>-1</sup>	93

## CONTAMINANTES ORGÁNICOS

Tabla I.3.12. Resumen de métodos de determinación de los compuestos orgánicos estudiados en muestras de material biológico.

Año	Preparación de muestra	Limpieza	Separación/ Detección	Obs.	Ref.
1994	MSPD: Dispersión en C18. Adsorbente gel de sílice, Eluyente hexano		GC-ECD GC-MS	PCBs, LOD: 0,17 $\mu\text{g.g}^{-1}$	115
1995	MSPD: Dispersión en C18. Adsorbente Florisil. Eluyente hexano:acetona		GC-ECD GC-MS	OCPs, PCBs LOD: 19,6– 111,2 $\text{ng.g}^{-1}$	116
1995	SFE: 80°C, 200 atm, modificador DCM; 60 min dinámica	Columnas de carbón grafitizado y Florisil, y gránulos de Cu	GC-MS	PCBs	127
1995	SFE: 100°C, 5000 psi, adsorbente alúmina básica, 0,5 min estática, 20 min dinámica, eluyente isooctano	Columna Florisil, tratamiento con ácido sulfúrico	GC-ECD GC-MS	PCBs, LOD: 10 $\text{ng.g}^{-1}$	128
1995	SFE: 65°C, 6000 psi, 30 min dinámica		GC-ECD	PCBs	134
1997	Soxhlet: DCM 12 h	GPC y columna de alúmina y sílice	GC-ECD	OCPs, PCBs	91
1997	SFE: 50°C 250 atm, dispersada en C18, adsorbente Florisil, 5 min estática, 20 min dinámica, elución hexano		GC-MS GC-ECD	OCPs, PCBs LOD: 1–15 $\text{ng.g}^{-1}$	135
1998	SFE: 65°C 134 bar, adsorbente alúmina, 10 min dinámica, eluyente hexano		GC-MS	PCBs, LOD: 10 $\text{pg.g}^{-1}$	131
1998	SLE: con hexano:acetona	Tratamiento con ácido sulfúrico	GC-MS	PBDEs	155
1999	Soxhlet: hexano:acetona 4h	Columna alúmina	GC-ECD	PBDEs	95

Tabla I.3.12. Resumen de métodos de determinación de los compuestos orgánicos estudiados en muestras de material biológico.

Año	Preparación de muestra	Limpeza	Separación/ Detección	Obs.	Ref.
1999	SFE: 50°C, 250 atm, adsorbente florisil, 5 min estática, 20 min dinámica, eluyente hexano		GC-ECD	OCPs, LOD: 1-6 ng.g <sup>-1</sup>	136
1999	SFE: 40°C 680 bar, adsorbente gel de sílice, 40 min dinámica, eluyente acetona:hexano		GC-ECD	OCPs, LOD: 1 ng.g <sup>-1</sup>	137
1999	Soxhlet: hexano:acetona	Tratamiento con ácido sulfúrico	GC-MS	PBDEs	156
1999	Soxhlet: hexano:DCM	Columna multicapa: sílice acidificada/sílice neutra/sílice basificada	GC-MS	PBDEs	157
2000	SPME: PDMS 90 min		GC-MS	OCPs, LOD: 0,03-0,9 ng.g <sup>-1</sup>	75
2000	SFE: 100°C 229 bar, dispersada en alúmina, adsorbente alúmina, 10 min estática, 50 min dinámica; Eluyente hexano	Cartucho de sílice	GC-ECD	PCBs, LOD: 7,2 ng.g <sup>-1</sup>	132
2001	SBSE : PDMS 45 min		GC-MS	PCBs, pg.mL <sup>-1</sup>	88
2001	Soxhlet: disolvente hexano:acetona, 6h	Columna multifásica: gel de sílice acidificada/ gel de sílice/ alúmina básica	GC-MS	PBDEs, LOD: 0,25-0,50 pg	97
2001	PLE : adsorbente gel de sílice acidificado, 100°C 5 minx2 ciclos, disolvente hexano		GC-MS	PCBs	144

## CONTAMINANTES ORGÁNICOS

Tabla I.3.12. Resumen de métodos de determinación de los compuestos orgánicos estudiados en muestras de material biológico.

Año	Preparación de muestra	Limpieza	Separación/ Detección	Obs.	Ref.
2001	Soxhlet: disolvente DCM:hexano, 16h	Columna Florisil, tratamiento con ácido sulfúrico	GC-AES	PBDEs; LOD: 0,9-1,7 ng.g <sup>-1</sup>	163
2002	Soxhlet: disolvente hexano:acetona, 24 h	GPC, columna de sílice	GC-MS	PBDEs, PCBs, OCPs	99
2002	Soxhlet: disolvente acetona:hexano, 2 h	columna de gel de sílice impregnada con ácido sulfúrico o alúmina y florisil impregnado con KOH	GC-ECD GC-MS	OCPs, PCBs, LOD: 0,1-0,5 ng.g <sup>-1</sup> de grasa	100
2002	Soxhlet: disolvente hexano:DCM, 2 h	columna gel de sílice ácida y columna de sílice ácida/sílice neutra/alúmina básica	GC-MS	PBDEs, PCBs; LOD: 0,05-0,5 ng.g <sup>-1</sup>	104
2002	Soxhlet: disolvente hexano:DCM:acetona, 2 h	columna gel de sílice ácida y columna de sílice ácida/sílice neutra/alúmina básica	GC-MS	PCBs, PBDEs, OCPs, LOD: 0,1-0,5 ng.g <sup>-1</sup> de grasa	107
2002	PLE: dispersión en florisil, adsorbente florisil, 40°C 2000psi, 10 minx2 ciclos, disolvente DCM:pentano		GC-ECD GC-MS	PCBs, LOD: 0,001-0,007 ng.g <sup>-1</sup>	145
2003	Soxhlet: disolvente hexano:acetona, 16 h	SPME: PDMS 25°C 30 min	GC-ECD	OCPs, LOD: 0,1-0,7 ng.g <sup>-1</sup>	86
2003	Soxhlet: disolvente acetona:hexano, 24 h	Tratamiento con ácido sulfúrico	GC-MS	PBDEs, LOD: 0,09-0,15 ng.g <sup>-1</sup>	101
2003	Soxhlet asistida por microondas : disolvente DCM, 100%, 90s x 6 ciclos	Columna de Florisil	GC-MS	OCPs, LOD: 0,4-17 ng.g <sup>-1</sup>	105



Tabla I.3.12. Resumen de métodos de determinación de los compuestos orgánicos estudiados en muestras de material biológico.

Año	Preparación de muestra	Limpieza	Separación/ Detección	Obs.	Ref.
2003	MSPD: dispersante Florisil, adsorbente Florisil, eluyente acetato de etilo		GC-ECD GC-MS	OCPs, LOD: 1 ng.g <sup>-1</sup>	111
2003	SFE: 50°C 300 atm, modificador metanol, eluyente acetato de etilo		GC-ECD GC-MS	OCPs	130
2003	ASE: 180°C, 1700 psi, 10min x 3 ciclos, disolvente DCM:hexano	Tratamiento con ácido sulfúrico, columnas de sílice y alúmina	GC-MS	PCBs	143
2004	LLE: tratamiento ácido sulfúrico y DMSO	SPME: PDMS/DVB 50 min 100°C	GC-AES	PCBs, LOD: 0,5-1 µg.g <sup>-1</sup>	87
2004	USE: disolvente acetona:hexano, 20min	Filtración a -24°C y cartucho de Florisil	GC-MS	OCPs, LOD: 0,5-5 ng.g <sup>-1</sup>	108
2004	MSPD : dispersión en Florisil, adsorbente Florisil		GC-ECD GC-MS	PCBs, LOD: 0,4 ng.g <sup>-1</sup> de grasa	112
2004	MAE: disolvente pentano:DCM 115°C 15min	Columna gel de sílice y GPC	GC-MS	PBDEs, OCPs, PCBs, LOD: 0,1 ng.g <sup>-1</sup>	124

### I.3.2.3. LIMPIEZA DE LOS EXTRACTOS

La limpieza es un paso importante y laborioso, necesario sobre todo en muestras sólidas, tanto en muestras biológicas como en sedimentos, para evitar problemas en la determinación con compuestos coextraídos con los analitos de interés. Principalmente, la coextracción de lípidos en muestras biológicas y azufre en sedimentos pueden causar un deterioro de

## ***CONTAMINANTES ORGÁNICOS***

---

la columna cromatográfica, contaminación del inyector y detector y coelución con los contaminantes estudiados<sup>149</sup>.

La limpieza se divide en dos tipos de procedimientos: destructivos y no destructivos. Los métodos destructivos consisten principalmente en el tratamiento alcalino (saponificación) o deshidratación oxidativa (tratamiento con ácido sulfúrico) y los métodos no destructivos se basan en la cromatografía de exclusión por tamaños y el fraccionamiento sólido-líquido basado en la polaridad<sup>16</sup>.

Sin embargo, los métodos destructivos podrían degradar algunos compuestos de interés (OCPs)<sup>148</sup>, mientras los métodos no destructivos generalmente requieren grandes volúmenes de disolvente y etapas múltiples, resultando métodos largos y laboriosos<sup>149</sup>.

En muchos casos la etapa de limpieza consta de varios pasos que combinan una etapa destructiva con una no destructiva, o varias no destructivas.

### **I.3.2.3.1. Tratamientos no destructivos**

Los procedimientos de limpieza no destructivos para la eliminación de lípidos suelen hacerse usando sólidos especiales sobre los cuales la velocidad de elución de los analitos y de los interferentes es muy distinta, principalmente cromatografía de adsorción (AC) o columnas de fase sólida (SPE) y cromatografía de exclusión por tamaños (GPC).

La cromatografía de exclusión por tamaños<sup>91,99,102,150,151</sup> (GPC) se usa para la separación de interferentes en base a su tamaño molecular, las moléculas grandes no se retienen y las pequeñas son las que eluyen más

tarde. La fase estacionaria utilizada es un gel hidrofóbico, normalmente copolímeros de estireno y divinilbenceno modificados con diferentes grupos funcionales (BIO Beads, Styragel) y povidextran (Sephadex).

Una gran ventaja de la GPC es que la columna puede usarse varias veces sin problemas de volúmenes de retención o capacidad de limpieza, además el procedimiento puede automatizarse y es adecuado para la purificación de matrices complejas con alto contenido lipídico<sup>152</sup>. La desventaja es que es muy difícil obtener una separación del 100 % de los interferentes, frecuentemente quedan trazas lo que hace necesario un posterior tratamiento o una segunda cromatografía de exclusión por tamaños<sup>148</sup>.

Las técnicas de limpieza mediante cromatografía de adsorción y extracción en fase sólida (SPE) son las más comunes, en ellas la elución con disolventes de diferente polaridad permite la separación de interferencias en una columna o cartucho que contiene al menos un adsorbente. Esta separación se basa en las diferencias de polaridad, solubilidad y partición entre las interferencias y los analitos en el disolvente y la fase estacionaria. Se pueden utilizar diferentes adsorbentes<sup>41</sup> normalmente alumina<sup>95,97,107,129</sup>, gel de sílice<sup>47,98,99,102,103,132,151,153</sup> o florisil<sup>44,105,127,128,154</sup>, en diferentes tamaños de partícula, diferentes niveles de activación, empaquetados en cartuchos o columnas de vidrio.

Pero en la mayoría de las ocasiones es necesario utilizar los adsorbentes combinados<sup>91,96,97,104,107,139,143</sup>, normalmente de gel de sílice, alúmina y en muchos casos se utiliza tras la destrucción de la matriz mediante un método de limpieza destructivo.

En muestras de sedimentos es necesario eliminar el azufre, para ello se ha usado tradicionalmente el tratamiento con cobre<sup>122,123,127</sup> después o durante la extracción. Otros métodos<sup>94,148</sup> para eliminar el azufre, además de la cromatografía de exclusión por tamaños, es la conversión del azufre a tiosulfato por sulfato de tetrabutilamonio.

#### **I.3.2.3.2. Tratamientos destructivos**

Los métodos destructivos que se han usado para la eliminación de los lípidos son el tratamiento alcalino (saponificación) y la deshidratación oxidativa por ácido sulfúrico.

Estas técnicas de limpieza no pueden usarse en muchas ocasiones debido a que se puede producir la degradación de los analitos. Por ejemplo, el dieldrin y endrin son sensibles al tratamiento con ácido sulfúrico y el DDT a la saponificación<sup>148</sup>.

El tratamiento alcalino se aplica al extracto de disolvente, los lípidos pueden saponificarse por calentamiento del extracto en un pequeño volumen de disolvente con hidróxido potásico etanólico al 20 % a 70°C durante 30 min.

En el tratamiento con ácido sulfúrico<sup>101,128,143,154,155,156</sup> éste se mezcla con el extracto lipídico (disuelto en hexano o hexano-DCM) y se agita vigorosamente durante unos minutos, el procedimiento de limpieza se repite 4-6 veces. Este método es muy usado principalmente combinado con una limpieza posterior mediante un método no destructivo.

Alternativamente, puede usarse una columna de gel de sílice impregnada con ácido sulfúrico<sup>93,94,97,100,107,157</sup>, normalmente en un 40 %

(p/p), por la que se hace pasar el extracto de la muestra. Éste es un método menos agresivo que el tratamiento directo con ácido sulfúrico.

#### **I.3.2.4. SEPARACIÓN Y DETECCIÓN**

La separación de compuestos orgánicos se lleva a cabo generalmente por cromatografía de gases (GC) o líquida (LC), dependiendo de su polaridad, volatilidad y el riesgo de descomposición a alta temperatura<sup>41</sup>.

La amplia variedad química de los contaminantes orgánicos en el medio ambiente hace que su detección sea una tarea importante, si bien su presencia a menudo a tan bajas concentraciones hace que ésta sea una labor difícil, siendo necesario el uso de detectores cromatográficos muy sensibles<sup>1</sup>.

También se han desarrollado técnicas semicuantitativas que permiten obtener una respuesta rápida y en muchos casos cualitativa como pueden ser los inmunoensayos<sup>120</sup>.

##### **I.3.2.4.1. Cromatografía de Gases (GC)**

Los compuestos orgánicos volátiles y térmicamente estables pueden analizarse por cromatografía de gases. Y aquellos que son inertes y relativamente apolares pueden inyectarse directamente sin previa derivatización.

La sensibilidad y selectividad del método va a depender del detector utilizado. La selectividad se consigue con detectores que respondan solamente a los compuestos objetivo, si estos compuestos contienen heteroátomos, los métodos empleados son GC detectores selectivos. Los

## ***CONTAMINANTES ORGÁNICOS***

---

más usados son captura electrónica (ECD) para compuestos halogenados, detectores de nitrógeno-fósforo (NPD) para compuestos con nitrógeno y fósforo y detectores que combinan excitación con plasma con espectroscopia de emisión atómica (MIP-AED)<sup>158</sup>.

El uso de espectrometría de masas (MS) acoplada con GC es aceptado como uno de los mejores caminos para la confirmación inequívoca de la identidad del pico y también para su cuantificación correcta si se usan estándares internos marcados isotópicamente<sup>115</sup>.

### **ECD:**

El detector de cromatografía de gases más común para compuestos halogenados es el detector de captura de electrones<sup>56,80,94,115,113,114,121,125,126,129,138,134,154,153</sup>. El ECD no es caro, es fácil de usar, altamente sensible y selectivo hacia compuestos halogenados que contienen uno o más átomos de halógeno. Sin embargo, presenta dos problemas principalmente: un comportamiento de respuesta lineal en un rango pequeño y una gran variación en la respuesta incluso con grupos homólogos<sup>41</sup>.

Recientemente, se comercializó el micro-ECD<sup>62</sup> con una celda de 150  $\mu\text{l}$  (frente a la normal de 380  $\mu\text{l}$ ) que produce una mejora en sensibilidad, linealidad y rango dinámico.

### **NPD:**

El detector nitrógeno-fósforo<sup>33,34,51,61,159,160,161,162</sup> también llamado detector termoiónico alcalino, detector específico termoiónico o detector de

ionización de llama alcalina, es el detector más usado para los compuestos que contengan estos dos elementos (nitrógeno y fósforo).

Es un detector que presenta bajos límites de detección, alta selectividad y sensibilidad para los compuestos fosforados. Sin embargo, al igual que el ECD, para los contaminantes halogenados, no ofrece la posibilidad de una identificación positiva, que sí ofrece el MS.

**AED:**

El AED<sup>87,158,163,164</sup> es una técnica sensible al elemento seleccionado que emplea un plasma para excitar los átomos de los compuestos eluidos, que son consecuentemente detectados. Presenta una gran selectividad ya que sólo responde a los compuestos que contengan el elemento o elementos seleccionados. Pero presenta una baja sensibilidad a los heteroátomos que contienen los compuestos estudiados en este trabajo, halógenos y fósforo, varios órdenes de magnitud por debajo de ECD y NPD.

**MS:**

La espectrometría de masas<sup>31,57,65,75,98,103,107,127,131,135,144,154,165,166</sup> se ha convertido en la alternativa preferida a ECD y NPD, es robusta y estable, pero requiere atención más especializada que las anteriores. Tiene la ventaja de permitir la identificación y confirmación de los resultados mediante el espectro de masas. Existen varios modos de ionización para la utilización de la espectrometría de masas, ionización química e impacto electrónico, lo que hace extremadamente flexible esta herramienta<sup>41</sup>.

## CONTAMINANTES ORGÁNICOS

---

El impacto electrónico<sup>59,99,104,128,150,151</sup> (EI), es el más usado, es selectivo ya que se efectúa la ionización del compuesto mediante impacto electrónico y se analizan los fragmentos sobre la base del valor del cociente masa/carga. Se obtienen espectros ricos en iones y reproducibles, la mayor desventaja es que presenta menor sensibilidad que el ECD y NPD, pero puede mejorarse utilizando técnicas como la monitorización de iones seleccionados. En el caso de los compuestos bromados y clorados estudiados el principal ion que se obtiene es el ion molecular y en los fosforados el fragmento  $m/z$  99, lo que representa un problema de selectividad debido a su bajo valor  $m/z$ . Esta técnica hace posible la cuantificación por dilución isotópica<sup>40</sup>.

Otra alternativa es la ionización química (CI), que es una forma de ionización más suave que conduce mayoritariamente a la obtención del ión molecular protonado, lo que supone una ventaja para la detección de los TAPs. Además, existe la ionización negativa de captura electrónica<sup>96,97,155,167</sup> (ECNI), que puede considerarse como un híbrido entre MS y ECD, más sensible pero sólo para moléculas que contengan 5 o más átomos de halógeno<sup>148</sup>, presentando unos excelentes límites de detección para estos compuestos pero con poca reproducibilidad.

Además, para mejorar la selectividad y alcanzar límites de detección más bajos puede emplearse la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) seleccionando adecuadamente el ión precursor y los iones productos. Así, procedimientos analíticos basados en GC-MS/MS normalmente dan resultados satisfactorios, para la identificación y cuantificación de



concentraciones bajas de contaminantes en matrices complejas como muestras biológicas<sup>57</sup>.

#### **I.3.2.4.2. Cromatografía Líquida (LC)**

La cromatografía líquida ha sido poco utilizada con los compuestos orgánicos estudiados. La detección cuantitativa no puede realizarse con detectores UV ya que estos analitos no absorben a longitudes de onda adecuadas<sup>41</sup>.

La cromatografía líquida acoplada con la espectrometría de masas (LC-MS) es una técnica ampliamente usada para la caracterización sensible y rápida, así como la cuantificación de los analitos en matrices complejas. Por ejemplo, las técnicas de ionización a presión atmosférica (electrospray ESI-MS o ionización química a presión atmosférica APCI-MS) ya se han usado para el estudio de compuestos organofosforados<sup>64,168</sup>.

La espectrometría de masas con electrospray es una técnica de ionización que tiene la posibilidad de analizar moléculas grandes y no volátiles. Sin embargo, los sistemas de electrospray son susceptibles de supresión de señal por la matriz de la muestra, siendo una desventaja significativa. Se han sugerido varios métodos para poder compensarlo o prevenirlo, incluyendo el uso de estándares internos, la adición de varios aditivos o tampones a la solución o la fase móvil y el uso de válvulas para dividir en fracciones y reducir los componentes de la matriz que llegan a la fuente de ionización<sup>168</sup>.

---

1. Baird, C., "Química Ambiental", Ed. Reverté, Barcelona (2001) pag. 299-366.

## ***CONTAMINANTES ORGÁNICOS***

---

2. Björklund, E.; Nilsson, T.; Bowadt, S., *Trends Anal. Chem.* **19** (2000) 434–445.
3. Repetto, M., “Toxicología fundamental”, Ed. Diez de Santos, Madrid (1997).
4. Pramauro, E., “Los pesticidas y el medio ambiente”, Servei Publicacions, Valencia (1990).
5. WHO Environmental Health Criteria 9. DDT and its derivatives. World Health Organisation. Geneva (1979).
6. WHO Environmental Health Criteria 40. Endosulfan. World Health Organisation. Geneva (1984).
7. WHO Environmental Health Criteria 38. Heptachlor. World Health Organisation. Geneva (1984).
8. WHO Environmental Health Criteria 91. Aldrin and Dieldrin. World Health Organisation. Geneva (1989).
9. WHO Environmental Health Criteria 123. Alpha- and Beta-Hexachlorocyclohexanes. World Health Organisation. Geneva (1991).
10. WHO Environmental Health Criteria 124. Lindane. World Health Organisation. Geneva (1991).
11. WHO Environmental Health Criteria 130. Endrin. World Health Organisation. Geneva (1992).
12. Database Physprop. Research Corporation. [www.syrres.com/esc/free-demos.htm](http://www.syrres.com/esc/free-demos.htm)
13. WHO Environmental Health Criteria 2. Polychlorinated biphenyls and terphenyls. World Health Organisation. Geneva (1976).
14. WHO Environmental Health Criteria 140. Polychlorinated biphenyls and terphenyls (second edition). World Health Organisation. Geneva (1992).

15. Erickson, M.D., "Analytical Chemistry of PCBs", Lewis Publishers, Boca Raton, Florida (1997).
16. Ahmed, F.E., *Trends Anal. Chem.* **22** (2003) 170–185.
17. WHO Environmental Health Criteria 152. Polybrominated biphenyls. World Health Organisation. Geneva (1994).
18. WHO Environmental Health Criteria 162. Polybrominated diphenyl ethers. World Health Organisation. Geneva (1994).
19. McDonald, T., *Chemosphere* **46** (2002) 745–755.
20. Sellström, U., "Determination of some polybrominated flame retardants in biota, sediment and sewage sludge". Doctoral Dissertation. Stockholm University. Sweden (1999).
21. EFRA: European Flame Retardant Association. <http://www.cefic-efra.com>.
22. Certain Brominated Flame Retardants– Polybrominated Diphenylethers, Polybrominated Biphenyls, Hexabromo Cyclodecane; OSPAR Commission (2001).
23. Posición común (CE) n° 21/2002, de 6 de diciembre de 2001, aprobada por el Consejo relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros que limitan la comercialización y el uso de determinadas sustancias y preparados peligrosos (éter de pentabromodifenilo), Diario Oficial de las Comunidades Europeas n° C 110 E, 07/05/2002, p. 0023 – 0026.
24. Directiva 2003/11/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de febrero de 2003, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros que limitan la comercialización y el uso de determinadas sustancias y preparados peligrosos (éter de pentabromodifenilo, éter de octabromodifenilo), Diario Oficial de las Comunidades Europeas n° L 042, 15/02/2003, p. 0045 – 0046.

## ***CONTAMINANTES ORGÁNICOS***

---

25. de Wit, C.A., *Chemosphere* **46** (2002) 583–624.
26. WHO Environmental Health Criteria 192. Flame retardants: A general introduction. World Health Organisation. Geneva (1994).
27. WHO Environmental Health Criteria 111. Triphenyl phosphate. World Health Organisation. Geneva (1991).
28. WHO Environmental Health Criteria 112. Tri n-butyl phosphate. World Health Organisation. Geneva (1991).
29. WHO Environmental Health Criteria 209. Flame retardants: tris(chloropropyl)phosphate and tris(2-chloroethyl)phosphate. World Health Organisation. Geneva (1998).
30. WHO Environmental Health Criteria 218. Flame retardants: Tris(2-butoxyethyl)phosphate, tris(2-ethylhexyl)phosphate and tetrakis(hydroxymethyl)phosphonium salts. World Health Organisation. Geneva (2000).
31. Fries, E.; Püttmann, W., *J. Environ. Monit.*, **3** (2001) 621–626.
32. De Geus, H.; Zegers, B.N.; Lingeman, H.; Brinkman, U.A.Th., *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* **56** (1994) 119–132.
33. Lebel, G.L.; Williams, D.T.; Benoit, F.M., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **64** (1981) 991–998.
34. Sjödin, A.; Carlsson, H.; Thuresson, K.; Sjölin, S.; Bergman, A.; Östman, C., *Environ. Sci. Technol.* **35** (2001) 448–454.
35. Saeger, V.W.; Hicks, O.; Kaley, R.G.; Michael, P.R.; Mieux, J.P.; Tucker, E.S., *Environ. Sci. Technol.* **13** (1979) 840–844.
36. Kawagoshi, Y.; Nakamura, S.; Fukunaga, I., *Chemosphere* **48** (2002) 219–225.

37. Möller, K.; Nilsson, U.; Crescenzi, C., *J. Chromatogr. A* **938** (2001) 121–130.
38. Reglamento (CE) n° 2364/2000 de la Comisión, de 25 de octubre de 2000, relativo a la cuarta lista de sustancias prioritarias prevista en el Reglamento (CEE) n° 793/93 del Consejo, Diario Oficial de las Comunidades Europeas n° L 273, 26/10/2000, p. 0005 – 0007.
39. Muir, D.C.G.; Grift, N.P., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **66** (1983) 684–690.
40. Eljarrat, E.; de la Cal, A.; Barceló, D., *J. Chromatogr. A* **1008** (2003) 181–192.
41. Barceló, D., “Sample Handling and Trace Analysis of Pollutants. Techniques, Applications and Quality Assurance de la serie Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry”, Ed. Elsevier, Ámsterdam (2000).
42. Kleiböhmer, W., “Environmental Analysis en Handbook of Analytical Separations” volume 3, Elsevier, Ámsterdam (2001), pag. 123–262.
43. Fuocco, R.; Colombini, M.P.; Abete, C.; Carignani, S., *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **61** (1996) 309–318.
44. Ishikawa, S.; Taketomi, M.; Shinohara, R., *Water Research* **19** (1985) 119–125.
45. Lopez-Avila, V.; Schoen, S.; Milanese, J.; Beckert, W.F., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **71** (1988) 375–387.
46. Kawagoshi, Y.; Fukunaga, I.; Itoh, H., *J. Mater. Cycles Waste Manag.* **1** (1999) 53–61.
47. Fatoki, O.S.; Awofolu, R.O., *J. Chromatogr. A* **983** (2003) 225–236.
48. Brito, N.M.; Navickiene, S.; Polese, L.; Jardim, E.F.G.; Abakerli, R.B.; Ribeiro, M.L., *J. Chromatogr. A* **957** (2002) 201–209.
49. Zhao, L.; Lee, H.K., *J. Chromatogr. A* **919** (2001) 381–388.

50. Norberg, J.; Thordarson, E., *Analyst* **125** (2000) 673–676.
51. Jonsson, O.B.; Nilsson, U.L., *J. Sep. Sci.* **26** (2003) 886–892.
52. Hyötyläinen, T.; Luethje, K.; Rautiainen-Raemae, M.; Riekkola, M.L., *J. Chromatogr. A* **1056** (2004) 267–271.
53. Dach, S.J.; Bayona, J.M., *Chemosphere* **35** (1997) 1669–1679.
54. Knepper, T.P.; Sacher, F.; Lange, F.T.; Brauch, H.J.; Karrenbrock, F.; Roerden, O.; Lindner, K., *Waste Management* **19** (1999) 77–99.
55. Martinez Vidal, J.L.; Pablos Espada, M.C.; Garrido Frenich, A.; Arrebola, F.J., *J. Chromatogr. A* **867** (2000) 235–245.
56. Lopez Blanco, M.C.; Reboreda Rodrtiguez, B.; Cancho Grande, B.; Simal Gandara, J., *J. Chromatogr. A* **976** (2002) 293–299.
57. Pitarch, E.; Serrano, R.; López, F.J.; Hernández, F., *Anal. Bioanal. Chem.* **376** (2003) 189–197.
58. Westbom, R.; Thorneby, L.; Zorita, S.; Mathiasson, L.; Bjorklund, E., *J. Chromatogr. A* **1033** (2004) 1–8.
59. Lacorte, S.; Guiffard, I.; Fraisse, D.; Barcelo, D., *Anal. Chem.* **72** (2000) 1430–1440.
60. Jimenez, J.J.; Bernal, J.L.; del Nozal, M.J.; Toribio, L.; Arias, E., *J. Chromatogr. A* **919** (2001) 147–156.
61. Weigel, S.; Bester, K.; Huhnerfuss, H., *J. Chromatogr. A* **912** (2001) 151–161.
62. Gomara, B.; Ramos, L.; Gonzalez, M.J., *J. Chromatogr. B* **766** (2002) 279–287.

- 
63. Sandau, C.D.; Sjodin, A.; Davis, M.D.; Barr, J.R.; Maggio, V.L.; Waterman, A.L.; Preston, K.E.; Preau, J.L.; Barr, D.B.; Needham, L.L.; Patterson, D.G., *Anal. Chem.* **75** (2003) 71–77.
64. Vanderford, B.J.; Pearson, R.A.; Rexing, D.J.; Zinder, S.A., *Anal. Chem.* **75** (2003) 6265–6274.
65. Meyer, J.; Bester, K., *J. Environ. Monit.* **6** (2004) 599–605.
66. Piedra, L.; Tejedor, A.; Hernando, M.D.; Aguera, A.; Barceló, D.; Fernández-Alba, A., *Chromatographia* **52** (2000) 631–638.
67. Lacassie, E.; Marquet, P.; Gaulier, J.M.; Dreyfuss, M.F., Lachatre, G., *Forensic Sci. Int.* **121** (2001) 116–125.
68. Creszenci, C.; Di Corcia, A., *J. Chromatogr. A* **733** (1996) 41–55.
69. Carro, A.M.; Cobas, J.C.; Rodríguez, J.B.; Lorenzo, R.A.; Cela, R., *J. Anal. At. Spectrom.* **14** (1999) 1867–1873.
70. Di Corcia, A.; Nazzari, M., *J. Chromatogr. A* **878** (2000) 87–98.
71. Hennion, M.C., *J. Chromatogr. A* **885** (2000) 73–95.
72. Cortazar, E.; Zuloaga, O.; Sanz, J.; Raposo, J.C.; Etxebarria, N.; Fernández, L.A., *J. Chromatogr. A* **978** (2002) 165–175.
73. Polo, M.; Gómez-Noya, G.; Quintana, J.B.; Llompарт, M.; García-Jares, C.; Cela, R., *Anal. Chem.* **76** (2004) 1054–1062.
74. Tomkins, B.A.; Barnard, A.R., *J. Chromatogr. A* **964** (2002) 21–33.
75. Hwang, B.H.; Lee, M.R., *J. Chromatogr. A* **898** (2000) 245–256.
76. Llompарт, M.; Li, K.; Fingas, M., *Anal. Chem.* **70** (1998) 2510–2515.
77. Bras, I.; Santos, L.; Alves, A., *J. Chromatogr. A* **891** (2000) 305–311.

## ***CONTAMINANTES ORGÁNICOS***

---

78. Isetun, S.; Nilsson, U.; Colmsjö, A., *Anal. Bioanal. Chem.* **380** (2004) 319–324.
79. Sakamoto, M.; Tsutsumi, T., *J. Chromatogr. A* **1028** (2004) 63–74.
80. Rohrig, L.; Meisch, H.U., *Fresenius J. Anl. Chem.* **366** (2000) 106–111.
81. Aguilar, C.; Peñalver, A.; Pocurull, E.; Ferre, J.; Borrull, F.; Marce, R.M., *J. Chromatogr. A* **844** (1999) 425–432.
82. Goncalves, C.; Alpendurada, M.F., *J. Chromatogr. A* **968** (2002) 177–190.
83. Popp, P.; Paschke, A., *Chromatographia* **49** (1999) 686–690.
84. Landin, P.; Llompart, M.; Lourido, M.; Cela, R., *J. Microcol. Sep.* **13** (2001) 275–284.
85. Perez Trujillo, J.P.; Frias, S.; Conde, J.E.; Rodríguez Delgado, M.A., *J. Chromatogr. A* **963** (2002) 95–105.
86. Fidalgo–Used, N.; Centineo, G. ; Blanco–González, E.; Sanz–Medel, A., *J. Chromatogr. A* **1017** (2003) 35–44.
87. Ramil Criado, M.; Rodriguez Pereiro, I.; Cela Torrijos, R., *J. Chromatogr. A* **1056** (2004) 263–266.
88. Benijts, T.; Vercammen, J.; Dams, R.; Tuan, H.P.; Lambert, W.; Sandra, P., *J. Chromatogr. B* **755** (2001) 137–142.
89. Björklund, E.; von Holst, C.; Anklam, E., *Trends Anal. Chem.* **21** (2002) 39–52.
90. Hess, P.; de Boer, J.; Coffino, W.P.; Leonardo, P.E.G.; Wells, D.E., *J. Chromatogr. A* **703** (1995) 417–465.
91. Brown, L., *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **33** (1997) 357–368.
92. Font, J.; Marsal, A., *J. Chromatogr. A* **811** (1998) 256–260.



- 
93. Bowadt, S.; Johansen, B.; Fruekilde, P.; Hasen, M.; Zilli, D.; Larsem, B.; de Boer, J., *J. Chromatogr. A* **675** (1994) 189–204.
94. Bowadt, S.; Johansson, B., *Anal. Chem.* **66** (1994) 667–673.
95. Allchin, C.R.; Law, R.J.; Morris, S., *Environ. Pollut.* **105** (1999) 197–207.
96. De Boer, J.; Allchin, C.; Law, R.; Zegers, B.; Boon, J.P., *Trends Anal. Chem.* **20** (2001) 591–599.
97. Christensen, J.H.; Platz, J., *J. Environ. Monit.* **3** (2001) 543–547.
98. Martens, D.; Gfrerer, M.; Wenzl, T.; Zhang, A.; Gawlik, B.M.; Schramm, K.W.; Lankmayr, E.; Kettrup, A., *Anal. Bioanal. Chem.* **372** (2002) 562–568.
99. Dodder, N.G.; Strandberg, B.; Hites, R.A., *Environ. Sci. Technol.* **36** (2002) 146–151.
100. Manirakiza, P.; Covaci, A.; Nizigiymana, L.; Ntzakimazi, G.; Schepens, P., *Environ. Pollut.* **117** (2002) 447–455.
101. Zhu, L.Y.; Hites, R.A., *Anal. Chem.* **75** (2003) 6696–6700.
102. Gfrerer, M.; Chen, S.; Lankmayr, E.P.; Quan, X.; Yang, F., *Anal. Bioanal. Chem.* **378** (2004) 1861–1867.
103. Lopez-Avila, V.; Young, R.; Beckert, W.F., *Anal. Chem.* **66** (1994) 1097–1106.
104. Covaci, A.; de Boer, J.; Ryan, J.J.; Voerspoels, S.; Schepens, P., *Anal. Chem.* **74** (2002) 790–798.
105. Prados-Rosales, R.C.; Luque Garcia, J.L.; Luque de Castro, M.D., *J. Chromatogr. A* **993** (2003) 121–129.
106. Luque-Garcia, J.L.; Luque de Castro, M.D., *J. Chromatogr. A* **998** (2003) 21–29.

107. Jacobs, M.N.; Covaci, A.; Schepens, P., *Environ. Sci. Technol.* **36** (2002) 2797–2805.
108. Hong, J.; Kim, H.Y.; Kim, D.G.; Seo, J.; Kim, K.J., *J. Chromatogr. A* **1038** (2004) 27–35.
109. Luque-García, J.L.; Luque de Castro, M.D., *Trends Anal. Chem.* **22** (2003) 41–47.
110. Barker, S.A., *J. Chromatogr. A* **885** (2000) 115–127.
111. Albero, B.; Sánchez-Brunete, C.; Tadeo, J.L., *J. Chromatogr. A* **1007** (2003) 137–143.
112. Ramil Criado, M.; Hernanz Fernandez, D.; Rodriguez Pereiro, I.; Cela Torrijos, R., *J. Chromatogr. A* **1056** (2004) 187–194.
113. Long, A.R.; Crouch, M.D.; Barker, S.A., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **74** (1991) 667–670.
114. Lott, H.M.; Barker, S.A., *J. AOAC Int.* **76** (1993) 663–668.
115. Ling, Y.C.; Chang, M.Y.; Huang, I.P., *J. Chromatogr. A* **669** (1994) 119–124.
116. Ling, Y.C.; Huang, I.P., *Chromatographia* **40** (1995) 259–266.
117. Barker, S.A., *J. Chromatogr. A* **880** (2000) 63–68.
118. Eskilsson, C.S.; Björklund, E., *J. Chromatogr. A* **902** (2000) 227–250.
119. Camel, V., *Trends Anal. Chem.* **19** (2000) 229–248.
120. Lopez-Avila, V.; Benedicto, J.; Charan, C.; Young, R.; Beckert, W.F., *Environ. Sci. Technol.* **29** (1995) 2709–2712.
121. Lopez-Avila, V.; Young, R.; Benedicto, J.; Ho, P.; Kim, R.; Beckert, W.F., *Anal. Chem.* **67** (1995) 2096–2102.

122. Parera, J.; Santos, F.J.; Galceran, M.T., *J. Chromatogr. A* **1046** (2004) 19–26.
123. Numata, M.; Yarita, T.; Aoyagi, Y.; Takatsu, A., *Anal. Sciences* **20** (2004) 793–798.
124. Bayen, S.; Lee, H.K.; Obbrad, J.P., *J. Chromatogr. A* **1035** (2004) 291–294.
125. Van der Velde, E.G.; de Haan, W.; Liem, A.K.D., *J. Chromatogr.* **626** (1992) 135–143.
126. Langerfeld, J.J.; Hawthorne, S.B.; Miller, D.J.; Pawliszyn, J., *Anal. Chem.* **65** (1993) 338–344.
127. Tong, P.; Imagawa, T., *Anal. Chim. Acta* **310** (1995) 93–100.
128. Lee, H.B.; Peart, T.E.; Niimi, A.J.; Knipe, C.R., *J. AOAC Int.* **78** (1995) 437–444.
129. Fernández, I.; Dachs, J.; Bayona, J.M., *J. Chromatogr. A* **719** (1996) 77–85.
130. Antunes, P.; Gil, O.; Bernardo-Gil, M.G., *J. Supercritical Fluids* **25** (2003) 135–142.
131. Turrio-Baldassarri, L.; di Domenico, A.; La Rocca, C.; Iacovella, N., *Microchemical J.* **59** (1998) 144–153.
132. López y López-Leitón, T.J.; Lage Yuste, M.A.; Alvarez Piñeiro, M.E.; Simal Lozano, J., *Chromatographia* **52** (2000) 109–111.
133. Järemo, M.; Björklund, E.; Nilsson, N.; Karlsson, L.; Mathiasson, L., *J. Chromatogr. A* **877** (2000) 167–180.
134. Alley, E.G.; Lu, G., *J. AOAC Int.* **78** (1995) 1051–1054.
135. Ling, Y.C.; Teng, H.C., *J. Chromatogr. A* **790** (1997) 153–160.
136. Ling, Y.C.; Teng, H.C.; Cartwright, C., *J. Chromatogr. A* **835** (1999) 145–157.

137. Fiddler, W.; Pensabene, J.W.; Gates, R.A.; Donoghue, D.J., *J. Agric. Food Chem.* **47** (1999) 206–211.
138. Hartonen, K.; Bowadt, S.; Hawthorne, S.B.; Riekkola, M.L., *J. Chromatogr. A* **774** (1997) 229–242.
139. Berset, J.D.; Holzer, R., *J. Chromatogr. A* **852** (1999) 545–558.
140. Richter, B.E.; Jones, B.A.; Ezzell, J.L.; Porter, N.L.; Avdalovic, N.; Pohl, C., *Anal. Chem.* **68** (1996) 1033–1039.
141. Schantz, M.M.; Nichols, J.J.; Wise, S.A., *Anal. Chem.* **69** (1997) 4210–4219.
142. Concha Grana, E.; Turnes Carou, M.I.; Muniategui Lorenzo, S.; Lopez Mahia, P.; Fernandez Fernandez, E.; Prada Rodriguez, D., *J. Chromatogr. A* **1047** (2004) 147–155.
143. Kim, B-H.; Jeong, J-S.; Chang, Y-S., *Food Add. Contamin.* **20** (2003) 659–667.
144. Müller, A.; Björklund, E.; von Holst, C., *J. Chromatogr. A* **925** (2001) 197–205.
145. Gómez-Ariza, J.L.; Bujalance, M.; Giráldez, I.; Velasco, A.; Morales, E., *J. Chromatogr. A* **946** (2002) 209–219.
146. Hubert, A.; Wenzel, K.D.; Manz, M.; Weissflog, L.; Engewald, W., *Anal. Chem.* **72** (2000) 1294–1300.
147. Heemken, O.P.; Theobald, N.; Wenclawiak, B.W., *Anal. Chem.* **69** (1997) 2171–2180.
148. de Boer, J.; Law, R.L., *J. Chromatogr. A* **1000** (2003) 223–251.
149. Wells, D.E., in: Barceló, D. (Ed.), "Environmental Analysis: Techniques, Applications and Quality Assurance", vol. 13, Elsevier, Amsterdam (1993) Chapter 3, pg.80–105.

150. Alae, M.; Sergeant, D.B.; Ikonomou, M.G.; Luross, J.M., *Chemosphere* **44** (2001) 1489–1495.
151. Luross, J.M.; Alae, M.; Sergeant, D.B.; Cannon, C.M.; Whittle, D.M.; Solomon, K.R.; Muir, D.C.G., *Chemosphere* **46** (2002) 665–672.
152. Ahmed, F.E., *Trends Anal. Chem.* **20** (2001) 649–661.
153. Needham, L.L.; Burse, V.W.; Price, H.A., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **64** (1981) 1131–1137.
154. Watanabe, I.; Kashimoto, T.; Tatsukawa, R., *Chemosphere* **16** (1987) 2389–2396.
155. Sellström, U.; Kierkegaard, A.; de Wit, C.; Jansson, B., *Environ. Toxicol. Chem.* **17** (1998) 1065–1072.
156. Kierkegaard, A.; Balk, L.; Tjärnlund, U.; de Wit, C.; Jansson, B., *Environ. Sci. Technol.* **33** (1999) 1612–1617.
157. Lindström, G.; Wingfords, H.; Dam, M.; van Bavel, B., *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **36** (1999) 355–363.
158. Lee, S.M.; Wylie, P.L., *J. Agric. Food Chem.* **39** (1991) 2192–2199.
159. Björklund, J.; Isetun, S.; Nilsson, U., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **18** (2004) 3079–3083.
160. Carlsson, H.; Nilsson, U.; Becker, G.; Östman, C., *Environ. Sci. Technol.* **31** (1997) 2931–2936.
161. Otake, T.; Yoshinaga, J.; Yamagisawa, Y., *Environ. Sci. Technol.* **35** (2001) 3099–3102.
162. Carlsson, H.; Nilsson, U.; Östman, C., *Environ. Sci. Technol.* **34** (2000) 3885–3889.

***CONTAMINANTES ORGÁNICOS***

---

163. Johnson, A.; Olson, N., *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **41** (2001) 339–344.
164. Becker, G.; Colmsjö, A.; Östman, A., *Anal. Chim. Acta* **340** (1997) 181–189.
165. Fries, E.; Püttmann, W., *J. Environ. Monit.* **5** (2003) 346–352.
166. Toda, H.; Sako, K.; Yagome, Y.; Nakamura, T., *Anal. Chim. Acta* **519** (2004) 213–218.
167. Sellström, U.; Jansson, B.; Kierkegaard, A.; de Wit, C., *Chemosphere* **26** (1993) 1703–1718.
168. Amini, N.; Crescenzi, C., *J. Chromatogr. B* **795** (2003) 245–256.

#### I.4. PLANIFICACIÓN DE EXPERIENCIAS EN QUÍMICA ANALÍTICA

La experiencia, como una de las formas de construir el saber, y su planificación juegan un importante papel en el desarrollo de la química analítica y de la estadística.

La quimiometría aborda la optimización de los procedimientos analíticos mediante el desarrollo de metodologías utilizando el *diseño experimental*<sup>1</sup> y su combinación con las estrategias formales de optimización permitiendo la obtención del óptimo con un mínimo de trabajo, tiempo y coste, siendo aplicada a diferentes técnicas y campos analíticos<sup>2,3,4,5</sup>.

Las herramientas y los procesos analíticos que proporcionan información analítica útil con gran rapidez, implican cambios estratégicos importantes en los planteamientos analíticos y están directamente relacionados con la automatización, la miniaturización y la simplificación. Sus objetivos directos están relacionados con la reducción del tiempo, coste y esfuerzo en el laboratorio. Ejemplos característicos de estos sistemas son los sistemas de criba, entre otros.

Los *sistemas de criba* (screening) tienen como objetivo evitar que todas las muestras se sometan a un proceso analítico completo. Están orientados a ofrecer respuestas binarias fiables que tienen como errores los falsos positivos y falsos negativos, presentan mayor énfasis cualitativo que cuantitativo, suelen necesitar un tratamiento de muestra simple y se caracteriza por su rapidez. Cuando la respuesta es positiva, entonces se

somete otra alícuota de la muestra al proceso analítico exhaustivo para ampliar la información.

En este trabajo se ha usado esta herramienta de planificación de experiencias tanto para la optimización de procesos como para la composición estratégica de muestras.

#### **I.4.1. PLANIFICACIÓN DE EXPERIENCIAS: ESTRATEGIA EXPERIMENTAL**

La metodología del diseño experimental designa al conjunto de métodos e instrumentos que pueden utilizarse para plantear un problema, dirigir la experimentación y aprovechar sus resultados. En el estudio de un problema es importante definir claramente los objetivos y elaborar una estrategia experimental para obtener los resultados lo más rápidamente posible asegurando su precisión<sup>4,5,6</sup>.

Toda estrategia experimental se elabora para establecer una relación causa–efecto entre los factores y las respuestas, es decir, una descripción de cómo se transforma el sistema utilizando un modelo matemático. La finalidad de encontrar este modelo es obtener una representación del fenómeno en el campo experimental estudiado y permitir una buena previsión en cualquier punto del campo experimental<sup>6</sup>.

Los factores son las variables que producen una influencia sobre el sistema, definiéndose como una cantidad o cualidad asociada al sistema que puede asumir valores de un contenido fijo de más de un valor. Normalmente están bajo el control del experimentador y se cambian a lo largo de los experimentos<sup>1</sup>.



Las respuestas son la cantidad o cualidad que puede ser influenciada por el sistema, no se encuentra bajo el control directo del experimentador, sino que varía en cada experimento ya que depende de los factores<sup>1</sup>.

Los objetivos de la estrategia experimental son establecer una jerarquía de los problemas a resolver y elegir la matriz de experiencias mas adecuada. Las matrices de experiencias son un conjunto de experiencias supuestamente homogéneas, realizadas consecutivamente, que no pueden utilizarse ni analizarse hasta que se hayan obtenido la totalidad de los resultados. Son objetos matemáticos abstractos contruidos a partir de variables sin dimensiones, codificadas o provistas de normas<sup>5,6</sup>. Están definidas por:

- El número de experiencias a realizar.
- Su naturaleza (niveles de las variables codificadas).
- Su organización en el tiempo (por lotes o secuenciales).

Por lo tanto, el procedimiento a seguir para resolver un problema analítico mediante el diseño experimental se basa en los siguientes puntos<sup>7</sup>:

- Reconocimiento y planteamiento del problema.
- Elección de los factores y niveles: es necesario elegir los factores que se van a variar y los niveles sobre los que se harán.
- Selección de la variable respuesta.

- Elección de un diseño experimental, es importante tener en cuenta los objetivos planteados, y requiere la medida de la respuesta en diferentes niveles de los factores.
- Realización del experimento, de acuerdo con el plan experimental.
- Análisis de datos, mediante métodos estadísticos, interpretados y comprendidos rápidamente.
- Conclusiones.

#### **I.4.2. OBJETIVOS DEL DISEÑO EXPERIMENTAL**

Las categorías de los problemas de investigación experimental pueden plantearse del siguiente modo<sup>6</sup>:

- Investigación exploratoria.
- Cribado de factores.
- Estudios cuantitativos de los factores.
- Estudios cuantitativos de las respuestas.

##### **I.4.2.1. INVESTIGACIÓN EXPLORATORIA**

En la investigación exploratoria se realizan experiencias destinadas a delimitar uno o varios campos experimentales, a elegir los valores que servirán de respuestas posteriormente y a controlar su validez<sup>8</sup>.

Los métodos utilizados para desarrollar esta fase son la estructuración de red, redes de Doehlert, repartición uniforme de puntos y método Montecarlo.

#### **I.4.2.2. CRIBADO DE FACTORES**

El cribado de factores consiste en investigar cuáles de los factores potencialmente influyentes lo son en realidad, en el campo experimental fijado. El número de experiencias crece exponencialmente en función del número de factores considerados.

Los métodos más usados son las matrices Hadamard o Plackett-Burman, las matrices supersaturadas, las ortogonales, las matrices factoriales completas y fraccionadas y las técnicas de cribado por grupos.

#### **I.4.2.3. ESTUDIOS CUANTITATIVOS DE LOS FACTORES**

Una vez conocidos los factores influyentes, se realiza un estudio más profundo de los mismos, considerando dos tipos de interacciones posibles entre factores, las que se pueden postular y cuya importancia se quiere conocer, y las que se ignoran y se quieren conocer.

Las matrices utilizadas son las matrices de experiencias factoriales, tanto simétricas como asimétricas, completas o fraccionadas.

#### **I.4.2.4. ESTUDIOS CUANTITATIVOS DE LAS RESPUESTAS**

El estudio cuantitativo de las respuestas consiste en conocer en cualquier punto del campo experimental de interés, el valor de una o varias respuestas experimentales. Para ello, es necesario determinar las relaciones

existentes entre los factores y las respuestas mediante un modelo, esto es lo que se denomina metodología de las superficies de respuesta<sup>7</sup>.

Las matrices de experiencias más utilizadas son matrices compuestas, matrices híbridas y matrices Doehlert.

### **I.4.3. OPTIMIZACIÓN DE PROCESOS**

En la optimización se busca descubrir las condiciones que producen la mejor respuesta, normalmente se realiza por monitorización de un factor sobre una respuesta experimental<sup>3</sup>.

El proceso de optimización se lleva a cabo empleando diseños secuenciales o diseños simultáneos. Sin embargo, cuando son muchas las respuestas que se quieren optimizar, a veces es difícil encontrar el óptimo, por lo que es necesario el uso de la optimización multicriterio.

#### **I.4.3.1. DISEÑOS SECUENCIALES**

Los diseños secuenciales se utilizan para obtener guía y dirección en los experimentos futuros cuando el experimentador tiene conocimientos limitados sobre la lejanía o proximidad de la región óptima<sup>3</sup>. Los métodos más usados son:

- Diseño simplex, un simplex es una figura n-dimensional más simple posible, donde cada dimensión o eje corresponde a un factor.
- Método de la ascensión de mayor pendiente, usa un modelo de superficie local para determinar el gradiente de un diseño global, produciendo un modelo matemático para el óptimo.

### I.4.3.2. DISEÑOS SIMULTÁNEOS

En los diseños simultáneos se llevan a cabo una serie de experimentos siguiendo un camino sistemático y se registran una o más respuestas para predecir un óptimo y los efectos de interacción usando análisis de regresión<sup>3</sup>. Existen varios tipos de métodos:

- Diseño factorial completo, incluye medidas de la respuesta para todas las combinaciones posibles de factores proporcionando información sobre los factores y las interacciones entre factores<sup>9</sup>.
- Diseño factorial fraccional, se evalúan los factores usando una fracción de experimentos del diseño factorial completo, algunas interacciones entre factores se confunden<sup>2</sup>.
- Diseño de estrella, las medidas se realizan en el punto central del dominio experimental y a un tamaño de paso ( $\alpha$ ), proporciona un camino simple para el ajuste al modelo, pero no considera las interacciones entre los diferentes factores<sup>3</sup>.
- Diseño central compuesto, es el resultado de la superposición de un diseño factorial a dos niveles y un diseño en estrella, evalúa los términos lineales, cuadráticos y de interacciones<sup>3</sup>.
- Diseño Doehlert, localiza los puntos experimentales en la superficie de una hiperesfera, permite el análisis de factores con diferente número de niveles<sup>3</sup>.
- Diseños mezcla, se utiliza cuando se está interesado en alguna propiedad de un producto o fenómeno que depende de la

proporción de cada constituyente de la mezcla estudiada. Existen una serie de limitaciones que implican que la variación de la proporción de un componente supone una variación de la proporción de las otras<sup>3</sup>.

#### **I.4.3.3. OPTIMIZACIÓN MULTICRITERIO: FUNCIÓN DE DESEABILIDAD**

La optimización multicriterio se utiliza debido a la imposibilidad de alcanzar a la vez las condiciones óptimas para varias respuestas a estudiar. Se busca una solución ideal de compromiso que tienda a satisfacer, lo mejor posible, el conjunto de los objetivos fijados de manera simultánea<sup>5,6</sup>.

La optimización mediante la función de deseabilidad consiste en combinar los valores de varias propiedades en una simple medida cuantitativa, representativa de la calidad total de compromiso.

Para ello, en primer lugar se realiza una modelización de los criterios, a continuación se transforma cada modelo en función de los objetivos, es decir, cada respuesta  $i$  se transforma a una escala adimensional de deseabilidad ( $d_i$ ), que va desde el valor 0 de respuesta no deseable a un valor 1 de respuesta completamente satisfactoria. Por último, se crea la función de deseabilidad que caracterice el compromiso global ( $D$ ).

De esta manera se puede calcular la deseabilidad global ( $D$ ) en todos los puntos del campo experimental, obteniéndose las coordenadas experimentales del valor máximo de esta función.

#### I.4.4. COMPOSICIÓN ESTRATÉGICA DE MUESTRA

Cuando se va a proceder al análisis de un gran número de muestras se puede actuar de tres maneras:

- Procedimiento clásico, es decir, analizando cada muestra ( $Sn$ ) de manera individual y, para garantizar los resultados, el análisis debe realizarse por duplicado. Por lo que, el número de análisis a realizar sería  $2n$ , siendo  $n$  el número de muestras individuales.
- Técnicas de cribado, mediante la composición de muestras utilizando matrices factoriales o matrices Plackett–Burman<sup>7</sup>. El número de muestras compuestas a analizar ( $m$ ) es mayor o igual al número de muestras individuales ( $n$ ).
- Matrices supersaturadas, es decir, composición de muestras utilizando matrices supersaturadas, en las que el número de muestras compuestas a analizar ( $m$ ) es inferior al número de muestras individuales ( $n$ ).

La composición de muestras es un procedimiento que permite manipular un número elevado de muestras analíticas minimizando el coste de las operaciones de laboratorio<sup>10</sup>, es decir, requiere menos análisis de laboratorio, lo que implica menos problemas de almacenamiento, registro y manipulación de muestras, pero puede conllevar la pérdida de información útil. Por ello, normalmente antes de realizar la composición de muestras debe realizarse una consideración cuidadosa de las ventajas e inconvenientes que en cada problema y estudio particular se acarrean<sup>11,12</sup>.

Para el uso de muestras compuestas en estudios analíticos deben cumplirse las siguientes condiciones:

- a) *Principio Pareto*, que solamente algunas de las muestras individuales ( $S_n$ ) están por encima de los límites establecido, es decir, que estén realmente contaminadas.
- b) El número de muestras individuales en cada muestra compuesta es tal que se garantiza la imposibilidad de falsos negativos por efectos de dilución.
- c) El número de muestras individuales que pueden entrar a formar parte de cada muestra compuesta viene dado por la relación entre los límites de detección de las técnicas analíticas y los límites de concentración exigidos para cada especie a controlar.

#### **I.4.4.1. USO DE MATRICES SUPERSATURADAS**

La composición de muestras basada en el uso de matrices supersaturadas es la mejor opción ya que el número de análisis se reduce considerablemente frente al procedimiento clásico, e incluso frente a las técnicas de cribado.

Pero presenta problemas asociados, ya que si el número de detecciones positivas esperadas es superior al 30 % del total de muestras individuales sería mejor utilizar matrices convencionales. Además, si el número de detecciones positivas fuese muy elevado, no tendría sentido usar la composición de muestras, ya que la confirmación de las muestras



positivas conduciría a un mayor número de experiencias que por el procedimiento clásico.

Además, hay que considerar que las matrices supersaturadas no son ortogonales, y su construcción y posterior resolución es más complicada que en el caso de las matrices de diseño clásicas. Esta falta de ortogonalidad afecta a la calidad de los estimados de los coeficientes del modelo matemático que describe o simula el fenómeno estudiado.

El proceso de composición de muestras consta de varias etapas, en primer lugar, es necesario definir el número de muestras individuales ( $Sn$ ) que pueden constituir la muestra compuesta, esto depende de diversos factores como la sensibilidad del método analítico, el nivel de concentración a detectar para evitar falsos negativos y otros factores a estudiar que dependen de los objetivos del estudio.

La decisión del número de muestras compuestas es complejo, se suele establecer mediante un compromiso entre un número lo suficientemente pequeño que produzcan un pequeño número de experiencias a realizar, y un número suficientemente grande que sea superior al número de efectos significativos esperados y que garantice una cierta ortogonalidad de la matriz.

Una vez decididas las dimensiones de la matriz, el siguiente paso es la construcción de la misma. Los primeros trabajos de este tipo de matrices se remontan a 1959<sup>13</sup>, en los que se propone su construcción de manera aleatoria. Posteriormente, Booth y Cox<sup>14</sup> (1962) avanzaron considerablemente al proponer sistemas de construcción de tipo

sistemático. Sin embargo, no fue hasta principios de los 90, cuando se propusieron matrices sobresaturadas realmente prometedoras y algoritmos para su generación sistemática<sup>15,16,17</sup>.

En 2000, Cela y col.<sup>18</sup> propusieron la generación de matrices supersaturadas utilizando algoritmos genéticos mediante la utilización del software SUPERGA 1.0, que permite de una manera simple y robusta, la construcción de matrices supersaturadas óptimas para cualquier problema de composición de muestras. Este ha sido el método utilizado para la generación de matrices supersaturadas en el presente trabajo.

Tras la generación de la matriz, se preparan las muestras compuestas de acuerdo con la estrategia definida en la matriz seleccionada. La posible automatización de este paso evitaría el tedioso trabajo que supone para el analista y posibles errores en la manipulación.

Una vez, que las muestras compuestas se han preparado y analizado, se realiza la estimación de los valores de la concentración de los analitos de interés en las muestras individuales, es decir, la resolución de las matrices supersaturadas. Existen diversos métodos de resolución: resolución mediante regresión en cresta<sup>19</sup>, regresión stepwise<sup>17</sup>, regresión all-subset<sup>20</sup> y regresión asistida por algoritmos genéticos<sup>21</sup>.

En 2001, Cela y col.<sup>22</sup> proponen un procedimiento robusto de localización del óptimo global en la regresión del sistema supersaturado mediante algoritmos genéticos, utilizando el software GAMICH 3.2, obteniendo resultados claramente satisfactorios para la resolución de

---

matrices supersaturadas. Este método fue utilizado en la resolución de las matrices propuestas en el presente trabajo.

- 
1. Deming, S.N.; Morgan, S.L., "Experimental design: a chemometric approach", Elsevier, Amsterdam (1993).
  2. Araujo, P.W.; Brereton, R.G., *Trends Anal. Chem.* **15** (1996) 26–31.
  3. Araujo, P.W.; Brereton, R.G., *Trends Anal. Chem.* **15** (1996) 63–70.
  4. Dreesbeke, J.J.; Fine, J.; Saporta, G., "Plans d'expériences: Applications à l'entreprise", Éditions Technip, Paris (1997).
  5. Lewis, G.A.; Mathieu, D.; Phan-Tan-Luu, R., "Pharmaceutical Experimental Design", Marcel Dekker Inc, New York (1999).
  6. Phan Tan Luu, R., "Metodología estadística en investigación medioambiental", Instituto Vasco de estadística, Vitoria (1993), pg. 179–210.
  7. Montgomery, D.C., "Design and analysis of experiments", John Wiley & sons, New York (1991).
  8. Watson, G.S., *Technometrics* **3** (1961) 371–388.
  9. Brereton, R.G., "Chemometrics: applications of mathematics and statistics to laboratory systems", Ellis Horwood, London (1990).
  10. Mack, G.A.; Robinson, P.E., "Use of composite samples to increase the precision and probability of detection of toxic chemicals". Chapter 13 in Breen, J.J. and Robinson, P.E. (Eds), "Environmental Applications of Chemometrics", ACS Symposium Series 292, American Chemical Society, Washington DC. (1984).
  11. Kratochvil, B., "Sampling for chemical analysis of the environment". Chapter 2 in Hurts, D.A. (Eds), "Trace residue analysis. Chemometric estimation of Sampling.

- Amount and error”, ACS Symposium Series 284, American Chemical Society, Washington DC. (1985).
12. Keith, L.H., “Environmental Sampling and Analysis: A Practical Guide”, Section I. Chapters 2–4, Lewis Publishers, Chelsea (1991).
13. Satterhwaite, F., *Technometrics* **1** (1959) 111–137.
14. Booth, K.H.V., Cox, D.R., *Technometrics* **4** (1962) 489–495.
15. Wu, C.F.J., *Biometrika* **80** (1993) 661–669.
16. Lin, D.K., *Technometrics* **35** (1993) 28–31.
17. Lin, D.K., *Technometrics* **37** (1995) 213–225.
18. Cela, R.; Martínez, E.; Carro, A.M., *Chemom. Intell. Lab. Sys.* **52** (2000) 167–182.
19. Hoerl, A.E.; Kennard, R.W., *Technometrics* **12** (1970) 55–67.
20. Chipman, H.; Hadama, M.; Wu, C.F.J., *Technometrics* **39** (1997) 372–381.
21. Holland, J.H., “Adaptation in Natural and Artificial Systems”, University of Michigan Press, Michigan (1975), p.211.
22. Cela, R.; Martínez, E.; Carro, A.M., *Chemom. Intell. Lab. Sys.* **57** (2001) 75–92.



## II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

---



En este trabajo se escogieron tres grupos de contaminantes medioambientales: mercurio y compuestos derivados, compuestos organohalogenados y compuestos organofosforados.

Algunos de los contaminantes, como el mercurio y derivados, pueden aparecer de manera natural, pero, en general, estos contaminantes se producen comercialmente y, en muchos casos, se han producido y empleado sin tener en cuenta su impacto medioambiental.

El mercurio y sus derivados han sido ampliamente usados y su impacto sobre el medio se conoce y se estudia, principalmente el efecto de los derivados organomercuriales sobre los seres vivos ligados al medio acuático. Por ello, algunos de sus usos han sido prohibidos y se ha establecido por la Comunidad Europea<sup>1</sup> una estricta normativa relacionada con los niveles de mercurio total en pescado comercializado de 0,5 mg.kg<sup>-1</sup> de peso fresco.

El grupo de compuestos organohalogenados estudiados abarca desde plaguicidas organoclorados (OCPs), bifenilos policlorados (PCBs), bifenilos polibromados (PBBs) hasta éteres de difenilo polibromados (PBDEs). Todos ellos se utilizaron en grandes cantidades hasta que se comenzó a descubrir su toxicidad y peligrosidad. Su prohibición progresiva desde mediados de los años 70 (PCBs) hasta 2006<sup>2,3</sup> (PBDEs) viene siendo objetivo prioritario por parte de las organizaciones internacionales competentes.

Los compuestos organofosforados estudiados fueron los trialkil-/arilfosfatos y bisfosfatos, y sus productos de hidrólisis. Para estos compuestos, su impacto medioambiental se desconoce todavía en gran medida. Su producción, previsiblemente, aumentará drásticamente debido

## ***JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS***

---

a la prohibición por la Unión Europea<sup>2,3</sup> de algunos pirorretardantes bromados, por lo que, es importante conocer su comportamiento en el medio ambiente.

La mayoría de estos compuestos llegan al medio por los efluentes acuosos, distribuyéndose entre los diferentes medios: agua, sedimentos y seres vivos, bioacumulándose en los tejidos grasos de los organismos acuáticos, y pudiendo llegar finalmente a sus consumidores (incluyendo los seres humanos).

El objetivo fundamental de esta tesis es el desarrollo de metodologías analíticas que permitan determinar los niveles de estos compuestos en el medio ambiente, principalmente en el medio acuático. Así, se pretende que pueda emplearse esta metodología para ampliar conocimientos sobre el comportamiento de estos compuestos en el medio acuático.

Para el desarrollo de nuevas estrategias de preparación de muestra se han usado diversas metodologías para la extracción de los compuestos de matrices tanto acuosas como sólidas, intentando minimizar el tiempo de análisis, y la cantidad de muestra y de disolventes orgánicos. La determinación final de los compuestos se llevó a cabo mediante técnicas cromatográficas acopladas a diferentes métodos de detección.

Se pueden considerar los siguientes objetivos parciales:

- Desarrollo de procedimientos analíticos para la determinación de mercurio y derivados organomercuriales mediante cromatografía de gases-espectroscopia de emisión atómica (GC-AES), utilizando extracción asistida por microondas (MAE) para la extracción de los compuestos de muestras sólidas, y microextracción en fase



sólida (SPME) para su concentración selectiva a partir de los extractos y muestras acuosas. Simultáneamente se realizó la derivatización de los compuestos para mejorar y facilitar su separación por cromatografía de gases.

- Evaluación de la composición estratégica de muestras para la monitorización de plaguicidas organoclorados en muestras de agua, utilizando extracción en fase sólida (SPE) como técnica de extracción y cromatografía de gases–detector de captura de electrones (GC–ECD) como técnica de determinación.
- Desarrollo de procedimientos analíticos para la determinación de compuestos organohalogenados en muestras biológicas: piensos para peces, peces y moluscos. Se desarrollaron diferentes técnicas de preparación de muestra, extracción con fluidos supercríticos (SFE) y dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD), utilizando microextracción en fase sólida (SPME) para la concentración de los analitos. La determinación se llevó a cabo mediante cromatografía de gases–detector de captura de electrones (GC–ECD), cromatografía de gases–espectrometría de masas (GC–MS) y cromatografía de gases–espectrometría de masas en tándem (GC–MS/MS).
- Desarrollo de un método de extracción en fase sólida (SPE) para la determinación mediante cromatografía líquida–espectrometría de masas en tándem (LC–MS/MS) de compuestos organofosforados y sus productos de hidrólisis.

## ***JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS***

---

1. Reglamento (CE) no 466/2001 de la Comisión, de 8 de marzo de 2001, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios, Diario Oficial de las Comunidades Europeas n° L 077, 16/03/2001, 0001-0013.
2. Posición común (CE) n° 21/2002, de 6 de diciembre de 2001, aprobada por el Consejo relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros que limitan la comercialización y el uso de determinadas sustancias y preparados peligrosos (éter de pentabromodifenilo), Diario Oficial de las Comunidades Europeas n° C 110 E, 07/05/2002, p. 0023 - 0026.
3. Directiva 2003/11/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de febrero de 2003, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros que limitan la comercialización y el uso de determinadas sustancias y preparados peligrosos (éter de pentabromodifenilo, éter de octabromodifenilo), Diario Oficial de las Comunidades Europeas n° L 042, 15/02/2003, p. 0045 - 0046.



### III. MEDIOS EXPERIMENTALES

---



### III.1. DISOLVENTES, REACTIVOS Y GASES

- Agua ultrapura (milli-Q®), obtenida en el laboratorio mediante un sistema de purificación de agua ultrapura (Millipore).
- Agua ultrapura (ELGA®) obtenida en el laboratorio mediante un sistema de purificación ELGA Maxima (ELGA).
- Metanol, grado HPLC (Merck y/o JT Baker).
- Isooctano, para análisis de trazas (Merck).
- Diclorometano, para análisis de pesticidas (Scharlau).
- Acetonitrilo, grado HPLC (Merck y/o JT Baker).
- Tolueno, pureza superior (Romil).
- Acetato de etilo, grado HPLC (Merck).
- Acetona, para análisis de trazas (Merck).
- Acetona 99% (Analema, Vorquímica) utilizada para la limpieza del material.
- n-Hexano, para análisis de trazas (Merck).
- Ácido ascórbico (Merck).
- Ácido fórmico 98% (Fluka).
- Ácido acético glacial 100% (Aldrich).
- Ácido acético, grado HPLC (JT Baker).
- Ácido nítrico 52,5% (Prolabo).
- Ácido clorhídrico 36% (Merck).
- Ácido sulfúrico 96% (Merck).
- Hidróxido sódico en lentejas 99% (Merck y/o BDH).
- Acetato sódico 99% (Aldrich).
- Cloruro sódico, para análisis (Merck).
- Sulfato sódico anhidro 99% (Panreac).

## ***MEDIOS EXPERIMENTALES***

---

- Gel de sílice, tamaño de poro 60 Å (0,040–0,063 mm, 230–400 *mesh*) (Merck).
- Óxido de aluminio básico activado (alúmina básica) 150 *mesh* (Aldrich).
- Florisil, 60–100 *mesh* (Aldrich).
- Octadecilsilano (C<sub>18</sub>, ODS), con un 9–12% de carbón (Aldrich).
- Tributilamina (Fluka).
- Tetraetilborato sódico 98% (Galab).
- Tetrafenilborato sódico 99,5% (Merck).
- Helio 99,999% (Carbuos metálicos) usado como gas portador en GC–AED y GC–MS.
- Oxígeno 99,999% (Carbuos metálicos) usado como gas auxiliar del detector AED.
- Hidrógeno 99,999 % (Carbuos metálicos) usado como gas auxiliar del detector AED.
- Nitrógeno 99,999% (Carbuos metálicos) usado para limpiar la ventana del detector AED y usado como gas portador en GC–ECD.
- Nitrógeno, generado en el laboratorio mediante un generador *Whatman Model 75–72* (Whatman), empleado como gas de secado y nebulización en HPLC–MS/MS.

### **III.2. PATRONES Y MATERIALES DE REFERENCIA**

- Cloruro de metilmercurio 98,5% (Merck).
- Cloruro de etilmercurio 99% (Merck).
- Dicloruro de mercurio 99,5% (Merck).
- Tricloruro de monobutilestaño 95% (Aldrich).
- Dicloruro de dibutilestaño 96% (Aldrich).

- Monocloruro de tributilestaño 96% (Aldrich).
- Monocloruro de tripropilestaño 98% (Merck).
- $\alpha$ -HCH 99,5%, 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  en MeOH (Supelco).
- $\gamma$ -HCH 99,9%, 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  en MeOH (Supelco).
- Heptacloro 96,4%, 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  en MeOH (Supelco).
- Aldrin 99,0%, 5000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  en MeOH (Supelco).
- 4,4'-DDT 98,4%, 5000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  en MeOH (Supelco).
- $\alpha$ -Endosulfan 99,8% (Riedel de Häen).
- Dieldrin 98,0% (Supelco).
- Endrin 98,8% (Riedel de Häen).
- Endrin cetona 98,5% (Supelco).
- Mezcla de PBDEs, 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  total en isooctano: BDE-47 (42,5%), BDE-99(10,9%), BDE-100 (39,3%), BDE-153 (1,9%), BDE-154 (2,7%) (Dr. Ehrenstorfer).
- Mezcla de PCBs, 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de cada congénere en isooctano: CB-10, CB-28, CB-52, CB-138, CB-153, CB-180 (Supelco).
- BB-15 99,8% (Supelco).
- BB-49 97% (Dr. Ehrenstorfer).
- Mezcla de PCBs marcados isotópicamente [ $^{13}\text{C}$ ], 5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de cada congénere en nonano: CB-28, CB-52, CB-101, CB-138, CB-153, CB-180 y CB-209 (Cambridge Isotope Laboratoies).
- Tri (2-cloroetil)fosfato (TCEP) 97% (Aldrich).
- Oxido de trifenilfosfina (TPPO) 98% (Aldrich).
- Tri (1-cloro-2-propil)fosfato (TCPP), mezcla 3 isómeros (Akzo Nobel).
- Tri n-propilfosfato (TPrP) 99% (Aldrich).
- Tri (1,3-dicloro-2-propil)fosfato (TDCP) 98,5% (Fluka).

## ***MEDIOS EXPERIMENTALES***

---

- Trifenilfosfato (TPhP) 99% (Aldrich).
- Tri i-butilfosfato (TiBP) 97% (Fluka).
- Tri n-butilfosfato (TnBP) 99% (Aldrich).
- Tri (2-butoxietil)fosfato (TBEP) 94% (Aldrich).
- Resorcinol bi(difenilfosfato) (RDP), mezcla técnica (Akzo Nobel).
- Bisfenol A bi(difenilfosfato) (BDP), mezcla técnica (Akzo Nobel).
- Tri(2-etilhexil)fosfato (TEHP) 97% (Aldrich).
- Difenilfosfato (DPhP) 99% (Aldrich).
- Monofenilfosfato (MPhP) 95% (Aldrich).
- Di n-butilfosfato (DnBP) 97% (Fluka).
- Di (2-etilhexil)fosfato (DEHP) 97% (Aldrich).
- Dibenzilfosfato (DBzP) 99% (Aldrich).
- TORT-1 (NRCC: National Research Council of Canada), material biológico de origen marino (hepatopáncreas de langosta), con un contenido certificado de metilmercurio de  $0,128 \pm 0,014 \text{ mg.kg}^{-1}$  (como Hg) y de mercurio total de  $0,33 \pm 0,06 \text{ mg.kg}^{-1}$  (como Hg).
- DOLT-2 (NRCC: National Research Council of Canada), material biológico de origen marino (hígado de mielga, *squalus acanthias*), con un contenido certificado de metilmercurio de  $0,693 \pm 0,053 \text{ mg.kg}^{-1}$  (como Hg) y de mercurio total de  $2,14 \pm 0,28 \text{ mg.kg}^{-1}$  (como Hg).
- DORM-2 (NRCC: National Research Council of Canada), material biológico de origen marino (músculo de mielga, *squalus acanthias*), con un contenido certificado de metilmercurio de  $4,47 \pm 0,32 \text{ mg.kg}^{-1}$  (como Hg) y de mercurio total de  $4,64 \pm 0,26 \text{ mg.kg}^{-1}$  (como Hg).
- CRM 463 (BCR: Community Bureau of Reference), material biológico de origen marino (atún), con un contenido certificado de metilmercurio de



3,04 ± 0,16 mg.kg<sup>-1</sup> (como MeHg) y de mercurio total de 2,85 ± 0,16 mg.kg<sup>-1</sup> (como Hg).

- PACS-2 (NRCC: National Research Council of Canada), sedimento marino, con un contenido certificado de mercurio total de 3,04 ± 0,20 mg.kg<sup>-1</sup> (como Hg).
- CRM 580 (BCR: Community Bureau of Reference), sedimento de estuario, con un contenido certificado de metilmercurio de 0,0755 ± 0,0037 mg.kg<sup>-1</sup> (como MeHg) y de mercurio total de 132 ± 3 mg.kg<sup>-1</sup> (como Hg).
- IAEA-356 (IAEA: International Atomic Energy Agency), sedimento marino, con un contenido certificado de metilmercurio de 0,00546 ± 0,00038 mg.kg<sup>-1</sup> (como Hg) y de mercurio total de 7,62 ± 0,61 mg.kg<sup>-1</sup> (como Hg).
- IAEA-406 (IAEA: International Atomic Energy Agency), tejido de pez de granja, con un contenido certificado de compuestos orgánicos clorados (OCP y PCBs) entre 0,27 y 4,00 ng.g<sup>-1</sup> (ver tabla IV.5.24).

### **III.3. MATERIAL**

- Material de vidrio de uso habitual en el laboratorio.
- Balanza analítica de precisión (Sartorius BP-211D).
- Balanza analítica (Sartorius BP-310S).
- Medidor de pH (Metrohm 654).
- Baño de ultrasonidos (P-Selecta®).
- Pipetas automáticas de 0,5–5 mL, 100–1000 µL y de 20–200 µL.
- Soporte de SPME para uso manual (Supelco).
- Fibra de SPME con recubrimiento de 100 µm de PDMS (polidimetilsiloxano) (Supelco).

## ***MEDIOS EXPERIMENTALES***

---

- Fibra de SPME con recubrimiento de 65  $\mu\text{m}$  de PDMS /DVB (polidimetilsiloxano/divilbenceno) (Supelco).
- Filtros de fibra de vidrio, 47 mm de diámetro, 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro (Whatman).
- Cartuchos de carbón grafitizado no poroso, SuperClean ENVI-Carb, 250 mg (Supelco).
- Cartuchos de divinilbenceno-n-vinilpirrolidona (DVB-VP) *OASIS HLB*, 60 mg (Waters).
- Cartuchos de divinilbenceno-poliestireno (DVB-PS) *Lichrolut EN 200* mg (Merck).
- Cartuchos de octadecilsilano (C18) *Lichrolut RP-18* 500 mg (Merck).
- Placa agitadora y calefactora (Selecta Agimatic-E).
- Barras agitadoras revestidas de PTFE de 4 mm de diámetro y 12 mm de longitud (Supelco).
- Soporte, pinza y nuez.
- Bomba de vacío de doble pistón (Nauberger).
- Muestreador automático (Crison).
- Bomba de agua, Aspirator A-3S (Eyela).
- Estación de extracción en fase sólida *Autotrace* (Zymark).
- Extractor de microondas MES - 1000 (CEM Corporation).
- Centrifuga con capacidad para 6 tubos de 25 ml (UNICEN).
- Extractor de fluidos supercríticos Hewlett-Packard 7680A, con una trampa empaquetada con octadecilsilano (ODS) (Hewlett Packard).
- Estación de concentración por corriente de nitrógeno Turbo-Vap II (Zymark).
- Miniconcentrador bajo chorro de nitrógeno, Mini-vap (Supelco).

### III.4. INSTRUMENTACIÓN ANALÍTICA

- Cromatógrafo de gases Agilent modelo 6890 Series Plus, con control electrónico de presión (EPC), con Detector de emisión atómica Agilent G2350A (Agilent Technologies). Columna cromatográfica multicapilar SE-54 (5% metilfenil, 95% dimetilsiloxano) de aproximadamente 920 capilares de 1 m de longitud x 40  $\mu\text{m}$  diámetro interno, 0,2  $\mu\text{m}$  de espesor de fase (Alltech Associates Inc).
- Cromatógrafo de gases Hewlett Packard modelo HP 5890 serie II, con Detector de emisión atómica modelo HP 5961A (Hewlett Packard). Columna cromatográfica DB-5ms (5% difenil, 95% dimetilsiloxano) de 30 m de longitud x 0,32 mm diámetro interno, 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor de fase (J & W Scientific).
- Cromatógrafo de gases Hewlett Packard modelo HP 5890 serie II Plus, con un Detector de captura electrónica y un inyector automático HP 7673 (Hewlett Packard). Columna cromatográfica capilar SPB-5 (5% difenil, 95% dimetilsiloxano) de 30 m de longitud x 0,32 mm diámetro interno, 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor de fase (Supelco).
- Cromatógrafo de gases Varian 3900 equipado con un detector de masas de trampa de iones 2100T y un inyector automático CP-8400 (Varian). Columna cromatográfica capilar HP-5ms (5% difenil, 95% dimetilsiloxano) de 30 m de longitud x 0,32 mm diámetro interno y 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor de fase (Hewlett Packard).
- Cromatógrafo de líquidos modelo HP 1100 consistente en una unidad desgasificadora, una bomba binaria de alta presión, un muestreador automático y un termostato para la columna cromatográfica, acoplado

a un espectrómetro de masas en tandem modelo *Quattro LA triple-stage*, equipado con una interfase de electrospray (ESI) modelo *Z-spray*, (Micromass). Columnas cromatográficas Luna C18 Phenomenex de 150x3 mm con un tamaño de partícula de 3 µm y Luna Phenyl-Hexyl Phenomenex de 150x2 mm con un tamaño de partícula de 3 µm.

### III.5. SOFTWARE

- Excel 97 (Microsoft).
- Statgraphics 3 Plus (Manugistics)<sup>1</sup>.
- Nemrod for Windows 95 (LPRAI, Université Aix-Marseille III)<sup>2</sup>.
- Superga (Universidad de Santiago de Compostela)<sup>3</sup>.
- Gamich (Universidad de Santiago de Compostela)<sup>4</sup>.

### III.6. LAVADO DEL MATERIAL

El lavado del material utilizado en este trabajo se realizó siguiendo los siguientes protocolos según su uso:

- El material usado para la determinación de mercurio y sus derivados organomercuriales, se lava con detergente libre de fosfatos (EXTRAN MA 03, Merck), agua del grifo, y agua milli-Q. Se deja en un baño ácido (HNO<sub>3</sub> al 10%) durante 24 horas. Posteriormente se lava con agua milli-Q y se seca con metanol.
- El material usado para la determinación de los compuestos orgánicos, se lava con detergente libre de fosfatos (EXTRAN MA 03, Merck), agua del grifo, y agua milli-Q y se seca con metanol.

---

1. *Statgraphics Plus V3*, Reference Manual. Manugistics, Rockville MD (1992).

2. *Nemrod for Windows 95*, LPRAI, Université Aix-Marseille III, Marsella.

3. Cela, R.; Martínez, E.; Carro, A.M., *Chemom. Intell. Lab. Sys.* **52** (2000) 167–182.
4. Cela, R.; Martínez, E.; Carro, A.M., *Chemom. Intell. Lab. Sys.* **57** (2001) 75–92.





## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---





## IV.1. DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE MERCURIO EN MUESTRAS ACUOSAS MEDIANTE MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA Y CROMATOGRAFÍA DE GASES CON COLUMNA MULTICAPILAR

En este trabajo se desarrolla un método rápido para la determinación de mercurio en muestras acuosas usando cromatografía de gases con columna multicapilar y detección con emisión atómica. También se ha estudiado la posibilidad de la determinación simultánea de compuestos de mercurio y estaño, basado en esta misma técnica.

En primer lugar se optimizaron las condiciones de separación y detección para la determinación simultánea de ambos grupos de especies (Hg y Sn) mediante cromatografía de gases utilizando una columna multicapilar y detección por emisión atómica.

A continuación, se ajustaron las condiciones de etilación con tetraetilborato sódico y de preconcentración mediante microextracción en fase sólida en espacio de cabeza de las especies de mercurio.

Finalmente, se estudió la aplicabilidad del procedimiento optimizado a la determinación de especies de mercurio en muestras reales, tanto de agua dulce como salada.

### IV.1.1. MATERIAL Y MÉTODOS

#### IV.1.1.1. PATRONES

Los reactivos comerciales usados fueron los siguientes:

Cloruro de metilmercurio ( $\text{MeHg}^+$ ), 98,5% (Merck)

Dicloruro de mercurio ( $\text{Hg}^{2+}$ ), 99,5% (Merck)

Monocloruro de tributilestaño (TBT), 95% (Aldrich)

Dicloruro de dibutilestaño (DBT), 96% (Aldrich)

Tricloruro de monobutilestaño (MBT), 96% (Aldrich)

Monocloruro de tripropilestaño (TPT), 98% (Merck)

A partir de estos reactivos comerciales se prepararon disoluciones patrón individuales de cada compuesto por pesada en el rango de 2–3  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  en metanol o en disolución acuosa de 1%  $\text{HNO}_3$  para mercurio inorgánico y se guardaron a  $-20^\circ\text{C}$ .

A partir de las disoluciones stock se prepararon por pesada y dilución en metanol o agua milli-Q patrones de trabajo de 2000  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 20  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  y 10  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  (como estaño) para los compuestos de estaño y de 2000  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 100  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  y 10  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  (como mercurio) para los compuestos de mercurio que se guardaron a  $-20^\circ\text{C}$ .

Se preparó semanalmente una mezcla de  $\text{MeHg}^+$  y  $\text{Hg}^{2+}$  en metanol de concentración aproximada 10  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  (como mercurio) que se guardó a  $4^\circ\text{C}$  y se utilizó para realizar adiciones en muestras a nivel de  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Finalmente, se preparó una disolución de TPT en metanol de 20  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  (como estaño) que se usó como patrón interno para corregir la variabilidad del proceso de derivatización – extracción.

#### **IV.1.1.2. OTRAS DISOLUCIONES**

La disolución tampón de pH 5 se preparó por disolución de acetato sódico (0,2  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) en agua milli-Q y se ajustó a pH 5 con ácido acético glacial.

La disolución del agente derivatizante, tetraetilborato sódico ( $\text{NaBEt}_4$ ), se preparó en concentraciones entre 0,1 y 0,5% (p/v) en agua milli-Q, renovándose cada 6 horas.

#### **IV.1.1.3. CONDICIONES INSTRUMENTALES DE MEDIDA**

La separación de los compuestos etilados de mercurio y estaño se realizó en un cromatógrafo de gases Agilent modelo 6890 Series Plus, con control electrónico de presión (EPC). La detección se llevó a cabo con un detector de emisión atómica Agilent G2350A.

Los compuestos etilados se separaron en una columna cromatográfica multicapilar SE-54 (5% metilfenil, 95% dimetilsiloxano) consistente en aproximadamente 920 capilares de 1 m de longitud x 40  $\mu\text{m}$  diámetro interno (0,2  $\mu\text{m}$  de espesor de fase). Las condiciones experimentales de medida aparecen resumidas en la tabla IV.1.1.

Tabla IV.1.1. Condiciones experimentales de medida del sistema GC-MIP-AES para la determinación de compuestos etilados de mercurio y estaño.

<b>Cromatógrafo de gases (GC)</b>	
Temperatura del inyector	270°C
Modo de Inyección	Splitless
Tiempo de purga	18 s
Flujo de split	140 mL.min <sup>-1</sup>
Presión en cabeza de columna	35 psi (1,3 min), después 55 psi
Programa Cromatográfico:	
Temp. Inicial (tiempo inicial)	40 °C (18 s)
Gradiente Temperatura	100 °C.min <sup>-1</sup>
Temp. Final (tiempo final)	200 °C (60 s)
Post Separación	220 °C (60 s)

Tabla IV.1.1. Condiciones experimentales de medida del sistema GC-MIP-AES para la determinación de compuestos etilados de mercurio y estaño.

<b>Parámetros del MIP-AES</b>	
Temperatura de la línea de transferencia	280 °C
Temperatura de la cavidad	280 °C
Longitudes de onda de trabajo:	
Estaño	271 nm
Mercurio	254 nm
Flujos de He:	
Flujo de make-up	120 mL.min <sup>-1</sup>
Flujo Total	200 mL.min <sup>-1</sup> (1,3 min), después 260 mL.min <sup>-1</sup>
Presiones de los gases de reacción:	
H <sub>2</sub>	20 psi
O <sub>2</sub>	30 psi
Tiempo de venteo del disolvente	0-0,7 min

#### **IV.1.1.4. PREPARACIÓN DE MUESTRAS**

Las muestras utilizadas para la optimización de las condiciones de detección se prepararon mediante un proceso de extracción líquido-líquido<sup>1</sup>. Los compuestos se derivatizaron directamente en la fase acuosa con tetraetilborato sódico (NaBEt<sub>4</sub>) a pH 5 y posteriormente fueron extraídos en isooctano. Para ello, se tomaron 10 mL de disolución tampón ácido acético/acetato sódico en un vial con tapa de 25 mL y se adicionó una cantidad conocida de patrones, se añadieron 2 mL de isooctano y 1 mL de NaBEt<sub>4</sub> al 1%, se agitó manualmente durante 5 minutos y se dejó reposar. La fase orgánica se separó y se inyectó en el sistema GC-MIP-AES.

Como aparece esquematizado en la figura IV.1.1, en los experimentos de SPME en espacio de cabeza, las muestras de agua (milli-Q o muestra real) se colocaron en un vial de 22 mL con una barra agitadora (12 mm largo x 4,5 mm ancho). Se ajustó el pH a 5 por adición de disolución tampón (1 mL de tampón 0,2 mol.L<sup>-1</sup> por cada 10 mL de muestra). Las muestras se adicionaron con la disolución de TPT (patrón interno, 20 µL) y con diferentes volúmenes (de 0 a 1000 µL) de la mezcla de patrones de MeHg<sup>+</sup> y Hg<sup>2+</sup> en metanol. El vial se cerró y se agitó manualmente durante 20 segundos. Se añadieron 0,5 mL de la disolución de NaEt<sub>4</sub> (0,1% p/v) a través del septum usando una jeringuilla de 1 mL. Se expuso la fibra de SPME al espacio de cabeza del vial 3 min, durante este tiempo la muestra se agita magnéticamente a 1100 r.p.m. Los analitos se desorben en el inyector del sistema GC-MIP-AES a 270°C durante 18 s.

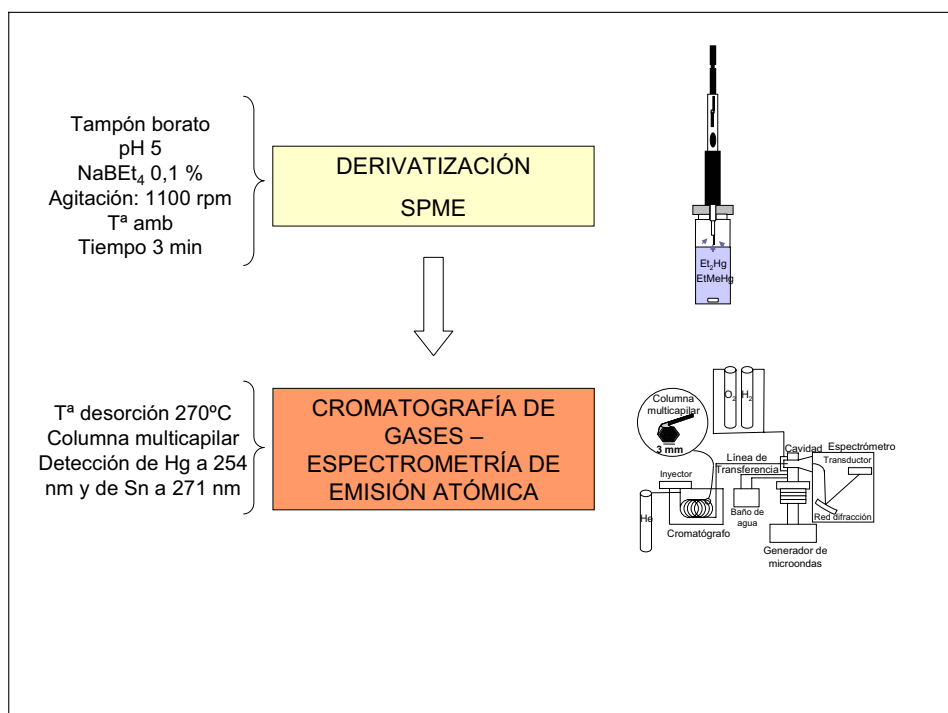


Figura IV.1.1. Esquema de preparación de muestra para la determinación de especies de mercurio en agua.

La fibra de PDMS se acondicionó antes de su uso por calentamiento en el inyector del cromatógrafo de gases a 250°C durante 60 min.

## **IV.1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **IV.1.2.1. OPTIMIZACIÓN CON LAS CONDICIONES DE DETECCIÓN SIMULTÁNEA DE ESPECIES DE Hg Y Sn**

Se estudió la separación y detección simultánea de compuestos organoestánicos y organomercurícos. Las condiciones de detección en el sistema MIP-AES han sido en numerosas ocasiones objeto de investigación para ambos grupos de compuestos<sup>2,3</sup>, aunque las condiciones óptimas son muy diferentes. Por lo tanto, en este caso se han buscado unas condiciones de compromiso de los flujos y las presiones de los diferentes gases para ambos grupos de compuestos.

Se realizó un estudio de la influencia de la presión de helio en cabeza de columna y la presión de hidrógeno y oxígeno en el plasma sobre la respuesta del detector MIP-AES para los compuestos de mercurio y estaño mediante un diseño factorial  $2^3+2$  puntos centrales.

En estos experimentos, el flujo de make-up de helio se ajustó en el valor mínimo permitido por el sistema GC-MIP-AES (120 mL.min<sup>-1</sup>). Los niveles para la presión de oxígeno y de hidrógeno se eligieron en función de los datos bibliográficos para la detección individual de mercurio<sup>3,4,5,6</sup> y estaño<sup>1,7,8</sup> usando GC-MIP-AES. El oxígeno se estudió en el rango 10–30 psi y el hidrógeno en el intervalo 20–50 psi. Los niveles de la presión en cabeza de columna se eligieron en función de los flujos de venteo de la cavidad en las regiones de la determinación individual de mercurio<sup>3,4,5,6</sup> y

estaño<sup>1,7,8</sup> (160–260 mL.min<sup>-1</sup>). Estos valores corresponden a flujos en columna entre 40 y 140 mL.min<sup>-1</sup> que corresponde a la región de máxima eficiencia de la columna multicapilar<sup>9</sup> (tabla IV.1.2).

Tabla IV.1.2. Dominio experimental de los factores seleccionados en el diseño experimental 2<sup>3</sup>+2 para la optimización de las condiciones de detección del sistema GC-MIP-AES.

Factor	Nivel Bajo (-1)	Nivel Medio (0)	Nivel Alto (+1)	Unidades
Presión O <sub>2</sub>	10	20	30	psi
Presión H <sub>2</sub>	20	35	50	psi
Presión He	15	35	55	psi

El diseño se ha realizado siguiendo los experimentos propuestos en la matriz de experiencias de manera aleatoria como se muestra en la tabla IV.1.3. También aparecen las respuestas obtenidas expresadas en cuentas de área.

Tabla IV.1.3. Matriz de experiencias y respuestas obtenidas para las especies de mercurio y estaño (cuentas de área) del diseño experimental 2<sup>3</sup>+2 para la optimización de las condiciones de detección del sistema GC-MIP-AES.

Matriz de experiencias randomizada				Respuestas (cuentas de área)				
Nº Exp.	Presión O <sub>2</sub>	Presión H <sub>2</sub>	Presión He	MeHg <sup>+</sup>	Hg <sup>2+</sup>	MBT	DBT	TBT
1	30	20	15	521,2	1634,0	72,1	62,8	34,0
2	20	35	35	367,9	1036,3	170,4	126,0	58,3
3	10	50	55	111,5	543,5	118,6	108,0	100,6
4	20	35	35	321,5	815,5	76,0	67,0	57,1
5	10	50	15	176,6	617,2	458,4	411,9	322,2
6	10	20	15	448,7	1599,9	290,5	266,1	246,3
7	30	50	55	146,2	714,4	55,7	48,2	33,8
8	30	50	15	164,6	549,1	170,8	146,6	120,3
9	30	20	55	267,1	1225,4	68,9	59,3	49,9
10	10	20	55	235,5	1308,3	8,2	15,9	11,0

Los experimentos se realizaron con una disolución patrón de compuestos etilados preparada mediante extracción líquido-líquido conteniendo especies de mercurio en un nivel de  $500 \text{ ng.mL}^{-1}$  (como mercurio) y de especies de estaño en un nivel de  $150 \text{ ng.mL}^{-1}$  (como estaño).

Se estudió la influencia de los factores sobre la respuesta, mediante el análisis de varianza y los gráficos Pareto utilizando el paquete estadístico Statgraphics<sup>10</sup>. En estos gráficos la longitud de las barras horizontales es proporcional al valor absoluto de los efectos estimados para cada factor frente al error estándar y la línea vertical indica el límite de significación con un umbral de significación del 5%, por lo tanto, aquellos factores cuyas barras superen el límite de significación se consideran estadísticamente significativos.

Como puede verse en la figura IV.1.2, la influencia de la presión de hidrógeno (B) fue negativa para todos los compuestos y, en el caso de metilmercurio y mercurio inorgánico, fue el único factor estadísticamente significativo para un nivel de confianza del 95%. El oxígeno (A) tuvo un menor efecto sobre la respuesta del MIP-AES para las especies de mercurio y estaño. La influencia de la presión en cabeza de columna de helio (C) fue positiva y estadísticamente significativa para MBT, DBT y TBT, mientras que para las especies de mercurio fue negativa pero sin alcanzar el nivel de significación estadística.



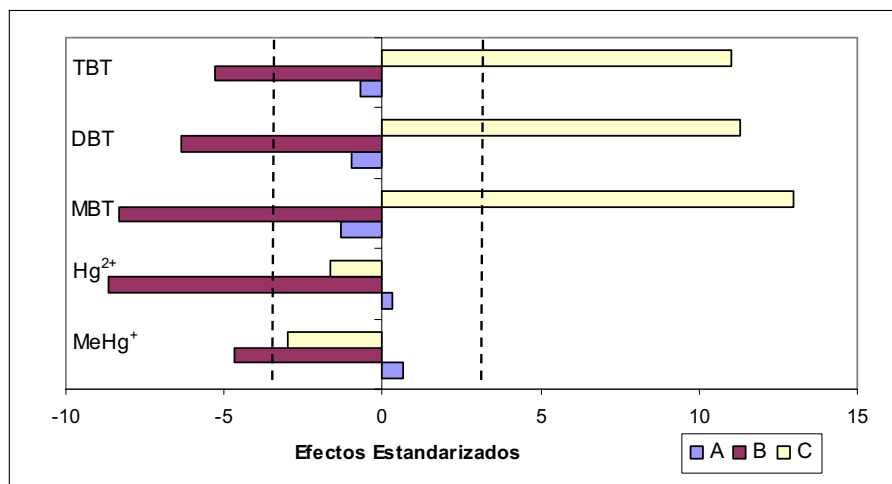


Figura IV.1.2. Gráfico Pareto de efectos principales estandarizados para la optimización de las condiciones de detección del sistema GC-MIP-AES. Factores: A, presión O<sub>2</sub>; B, presión H<sub>2</sub>; C, presión en cabeza de columna de Helio.

En los siguientes experimentos, se fijó la presión de hidrógeno en 20 psi. La presión de oxígeno se fijó en 30 psi (nivel alto) para evitar la formación de depósitos de carbón en el plasma. La influencia de la presión en cabeza de columna de helio se estudió con más detalle mediante un método univariante, modificando la presión entre 15–55 psi.

Como se muestra en la gráfica (figura IV.1.3), la respuesta para MeHg<sup>+</sup> y Hg<sup>2+</sup> permanece más o menos constante entre 15 y 35 psi, disminuyendo considerablemente a presiones mayores, mientras que para los compuestos organoestánicos la respuesta aumenta con la presión en cabeza de columna de helio (de 15 a 55 psi). Por lo tanto, se decidió realizar una programación sobre la presión en cabeza de columna para alcanzar las condiciones óptimas para cada grupo de compuestos. Así, se mantuvo una presión de 35 psi desde el principio hasta 1,3 minutos, tiempo suficiente para que eluyan los compuestos de Hg y después se elevó rápidamente hasta 55 psi durante la separación de los compuestos de Sn.

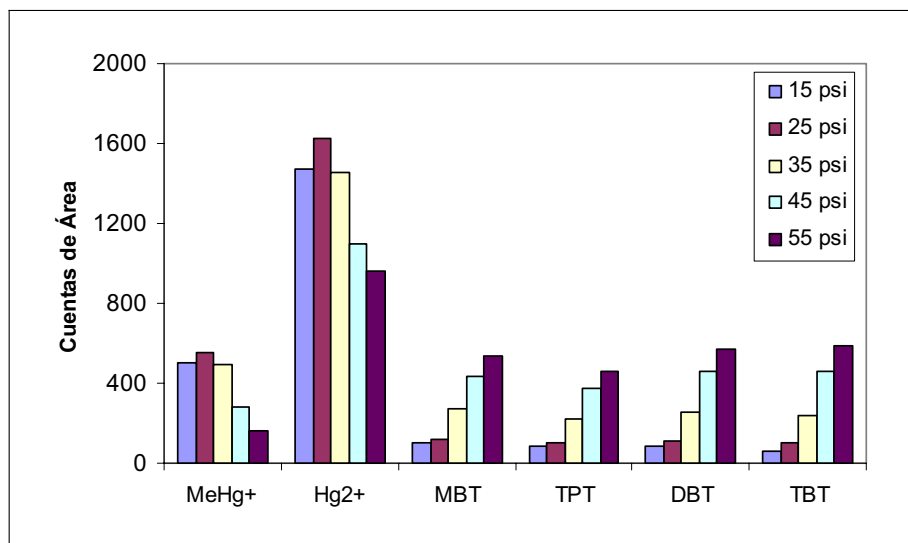


Figura IV.1.3. Estudio univariante de la presión de helio en cabeza de columna.

#### IV.1.2.2. IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE DETECCIÓN

En las condiciones óptimas se obtiene la separación de los analitos en menos de 3 minutos con buenos límites de detección del orden de  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

Tabla IV.1.4. Tiempos de retención de los compuestos de mercurio y estaño.

Compuestos	Tiempo de retención/min
MeHg <sup>+</sup>	0,77
Hg <sup>2+</sup>	1,05
MBT	1,53
TPT	1,63
DBT	1,79
TBT	2,05

La Figura IV.1.4 presenta un cromatograma de un patrón de los compuestos de mercurio y estaño obtenido bajo las condiciones óptimas de

detección y la tabla IV.1.4 muestra los tiempos de retención para cada compuesto.

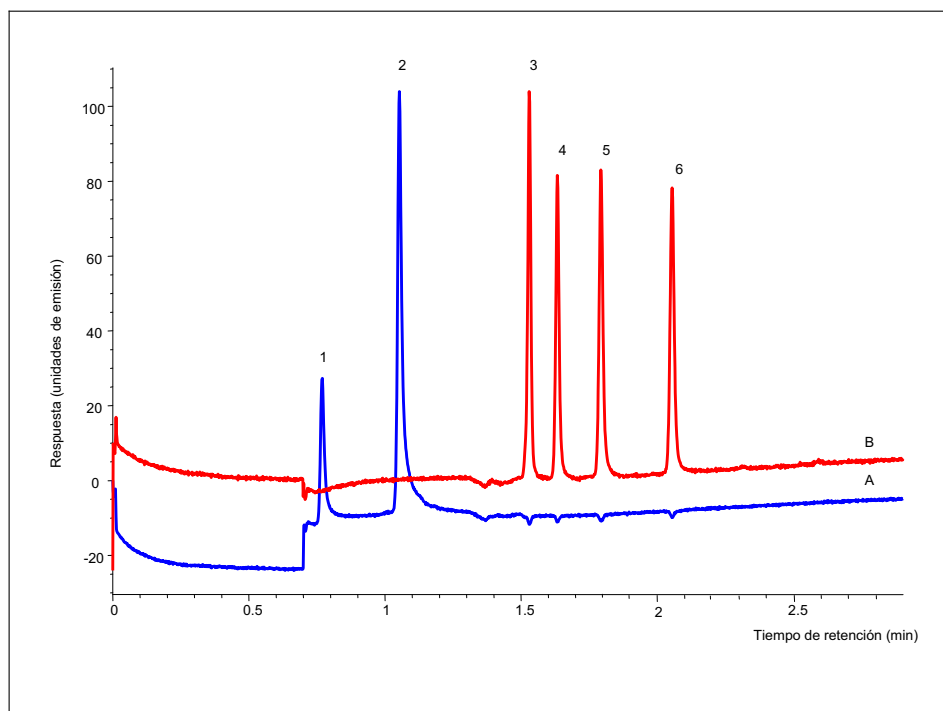


Figura IV.1.4. Cromatograma de GC-MIP-AES para la determinación simultánea de los compuestos de mercurio ( $500 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) y estaño ( $150 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) como especies etiladas (inyección directa): 1,  $\text{MeHg}^+$ ; 2,  $\text{Hg}^{2+}$ ; 3, MBT; 4, TPT; 5, DBT; 6, TBT. A, línea de emisión de Hg a  $254 \text{ nm}$ ; B, línea de emisión de estaño a  $271 \text{ nm}$ .

Bajo estas condiciones de trabajo como puede verse en la tabla IV.1.5, se obtuvieron unos límites de cuantificación ( $S/N=10$ ) de  $0,4 \text{ ng.mL}^{-1}$  y  $3 \text{ ng.mL}^{-1}$  para las especies de estaño y mercurio, respectivamente, tomando un volumen de inyección de  $1 \mu\text{L}$ . La repetibilidad, expresada como coeficiente de variación (C.V.) de 6 inyecciones consecutivas de un patrón de especies etiladas de  $100 \text{ ng.mL}^{-1}$  (como mercurio) para las especies de mercurio y  $75 \text{ ng.mL}^{-1}$  (como estaño) para las especies de estaño está comprendida entre 1 y 2 %. Los coeficientes de correlación fueron mayores de 0,994 en el intervalo de concentraciones de 3 a  $800 \text{ ng.mL}^{-1}$ .

Tabla IV.1.5. Parámetros de validación del método de determinación de los compuestos etilados de mercurio y estaño mediante inyección directa.

Compuesto	Linealidad / r (a)	Repetibilidad / C.V. % (b)	LODs / ng.mL <sup>-1</sup> (c)	LOQs / ng.mL <sup>-1</sup> (d)
MeHg <sup>+</sup>	0,9957	1,7	0,93	3,1
Hg <sup>2+</sup>	0,9986	0,9	0,96	3,2
MBT	0,9970	1,2	0,13	0,42
DBT	0,9945	1,0	0,13	0,45
TBT	0,9952	1,1	0,14	0,47

(a) Calibración a 7 niveles (3–800 ng.mL<sup>-1</sup>; concentración del patrón interno (TPT): 200 ng.mL<sup>-1</sup>); (b) patrón de 100 ng.mL<sup>-1</sup> de mercurio y 75 ng.mL<sup>-1</sup> de estaño (n = 6); (c) definidos para una relación señal/ruido (S/N) de 3; (d) definidos para una relación S/N de 10.

Por lo tanto, se comprobó la posibilidad de determinación simultánea de especies de mercurio y estaño mediante cromatografía de gases acoplada con detección de emisión atómica. Este método posee unas buenas características de linealidad, repetibilidad y límites de detección y cuantificación para ambas familias de compuestos.

#### IV.1.2.3. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE DERIVATIZACIÓN/ EXTRACCIÓN PARA LAS ESPECIES DE Hg

Para la optimización de las condiciones de microextracción en fase sólida (SPME), de acuerdo con estudios previos<sup>11,12,13</sup>, se fijaron las siguientes variables: pH 5 para la muestra, temperatura ambiente (20°C) para la realización de la extracción, fibra PDMS y modo en espacio de cabeza sobre la muestra. Así, sólo fueron evaluados los efectos del tiempo de muestreo, volumen de muestra, agitación magnética y concentración de borato, junto con el tiempo de desorción de la fibra.

La influencia de la concentración de  $\text{NaBEt}_4$  en la respuesta del detector se ha estudiado para asegurar el uso de la cantidad necesaria para la derivatización total de los compuestos. Para ello, se prepararon muestras de agua milli-Q adicionada con un contenido de especies de mercurio en un nivel de  $200 \text{ ng.L}^{-1}$  (como mercurio) y se añadió 0,5 mL de  $\text{NaBEt}_4$  con concentraciones crecientes entre 0,1 y 1% (p/v).

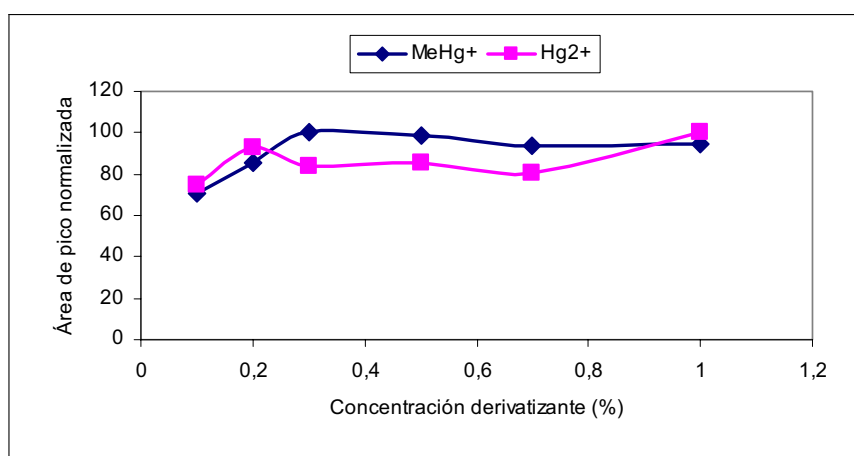


Figura IV.1.5. Perfiles de la influencia de la concentración de agente derivatizante.

La eficiencia de extracción de los compuestos etilados no está afectada por la concentración del agente derivatizante como puede verse en la figura IV.1.5, sin embargo, la estabilidad de la línea base del cromatograma, en el canal del mercurio, se ve perturbada por el uso de un exceso de borato (figura IV.1.6). Así, la concentración de  $\text{NaBEt}_4$  se fijó al 0,1%.

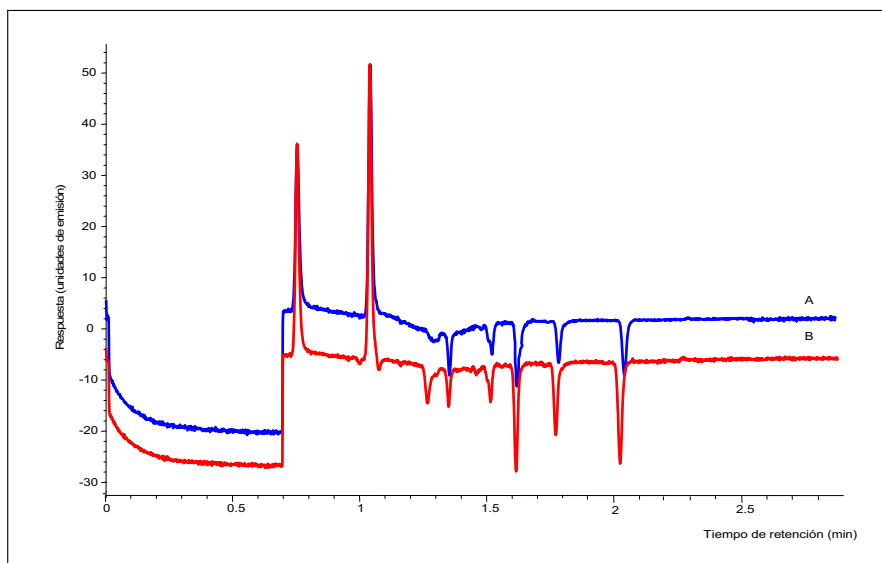


Figura IV.1.6. Cromatogramas de GC-MIP-AES de la línea de emisión de Hg a 254 nm con diferentes concentraciones de agente derivatizante. A, concentración de borato de 0,1%; B, concentración de borato de 1%.

También se estudió el tiempo de desorción cargando la fibra de SPME con grandes cantidades ( $1000 \text{ ng.L}^{-1}$ ) de los compuestos organometálicos etilados y colocándola en el inyector del cromatógrafo de gases por períodos consecutivos de 6 s. Después de la tercera desorción no quedan analitos en la fibra, por lo tanto, se fijó el tiempo de desorción en 18 s.

Se estudió la influencia de la agitación magnética, el tiempo de exposición y el volumen de muestra sobre el rendimiento de la microextracción mediante un diseño factorial  $2^3+2$  puntos centrales. El tiempo de exposición se fijó entre un nivel bajo del orden de magnitud del tiempo de separación cromatográfico (2 min) y un nivel alto para un tiempo en el que se supone que se ha alcanzado el equilibrio entre el espacio de cabeza y la fibra (25 min). El factor cualitativo agitación se consideró en un nivel bajo en el que no se realizaba la agitación de la muestra y un nivel

alto en el que se agitaba a 1100 r.p.m. Los niveles de volumen de muestra (2 y 14 mL) se eligieron en función de la capacidad del vial (tabla IV.1.6).

Tabla IV.1.6. Dominio experimental de los factores seleccionados en el diseño experimental  $2^{3+2}$  para la optimización de las condiciones de SPME.

Factor	Nivel Bajo (-1)	Nivel Medio (0)	Nivel Alto (+1)	Unidades
Agitación	Sin		Con	
Tiempo de exposición	2	13,5	25	min
Volumen de muestra	2	8	14	mL

Los experimentos se realizaron con una muestra de agua milli-Q con adición de especies de mercurio de  $100 \text{ ng.L}^{-1}$ , siguiendo la matriz de experiencias aleatoria que se muestra en la tabla IV.1.7.

Tabla IV.1.7. Matriz de experiencias y respuestas obtenidas para las especies de mercurio (cuentas de área) del diseño experimental  $2^{3+2}$  para la optimización de las condiciones de SPME.

Nº Exp.	Matriz de experiencias randomizada			Respuestas (cuentas de área)	
	Agitación	Tiempo de exposición	Volumen de muestra	MeHg <sup>+</sup>	Hg <sup>2+</sup>
1	Sin	25	14	18,3	35,4
2	Sin	13,5	8	13,3	18,5
3	Con	25	14	50,2	97,2
4	Sin	2	2	5,3	9,2
5	Con	25	2	12,3	52,3
6	Con	13,5	8	34,4	108,4
7	Con	2	14	19,1	22,2
8	Sin	25	2	14,0	13,4
9	Sin	2	14	9,3	24,9
10	Con	2	2	10,5	3,0

Se estudió la influencia de los factores sobre la respuesta utilizando el paquete estadístico Statgraphics<sup>10</sup>. Como se muestra en la figura IV.1.7, en el caso de las especies de mercurio, todos los factores muestran una influencia positiva sobre el rendimiento pero sin alcanzar el nivel de significación estadístico, siendo la agitación magnética (A) el más importante.

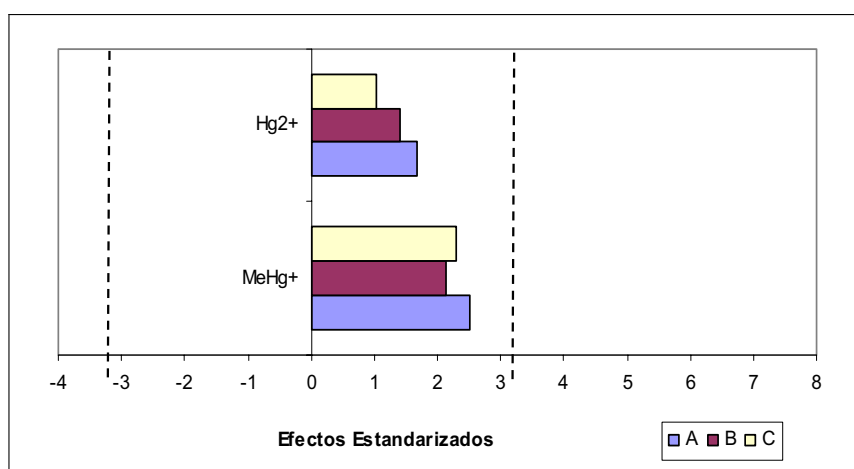


Figura IV.1.7. Gráfico Pareto de efectos principales estandarizados para la optimización de las condiciones de SPME. Factores: A, agitación magnética; B, tiempo de muestreo; C, volumen de muestra.

A partir de estos resultados, se decidió fijar el volumen de muestra en 14 mL y agitar las muestras magnéticamente. En estas condiciones, se estudió la cinética del proceso para poder fijar un tiempo de extracción más corto para el que no haya una pérdida importante de la respuesta, para ello, se prepararon muestras de agua milli-Q con adición de especies de mercurio en un nivel de 1,7 ng.mL<sup>-1</sup> (como mercurio) y se expuso la fibra al espacio de cabeza de la muestra entre 0,5 y 20 minutos.

Se observa en la figura IV.1.8 que después de 3 minutos la eficacia de extracción es aproximadamente el 80% del máximo para todos los compuestos. Así, el muestreo en espacio de cabeza se limitó a 3 min.



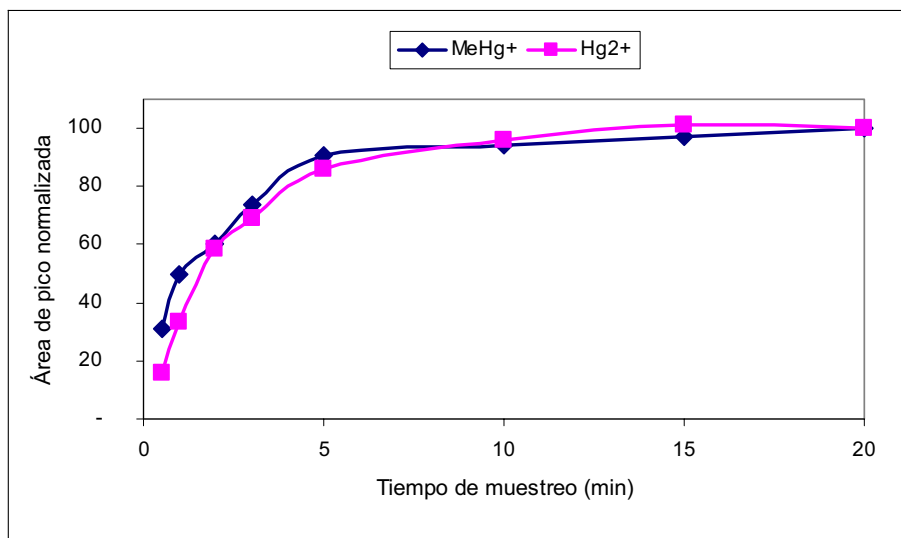


Figura IV.1.8. Cinética de extracción en espacio de cabeza obtenida con agitación magnética y un volumen de muestra de 14 mL.

Finalmente, las condiciones óptimas de extracción mediante SPME se fijaron según se indica en la tabla IV.1.8.

Tabla IV.1.8. Condiciones óptimas de extracción mediante SPME.

Factor	Valor	Unidades
Agitación	Con	
Tiempo de exposición	3	min
Volumen de muestra	14	mL
Concentración de borato	0,1	%
Tiempo de desorción	18	s

#### IV.1.2.4. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Se investigó la linealidad del método usando muestras de agua milli-Q adicionada con especies de mercurio de 0 a 1.000 ng.L<sup>-1</sup>, el TPT también se añadió a nivel de 20 ng.L<sup>-1</sup> y se usó como patrón interno. Los coeficientes de correlación obtenidos para todos los compuestos estilados estaban

entre 0,995 y 0,997. La repetibilidad del proceso, expresada como coeficiente de variación (C.V.), de 6 inyecciones consecutivas de una muestra de agua adicionada con 100 ng.L<sup>-1</sup> (como mercurio) para las especies de mercurio está comprendida entre 5 y 6%. Se obtuvieron unos límites de cuantificación (S/N=10) de 8 y 11 ng.L<sup>-1</sup>, para metilmercurio y mercurio inorgánico, respectivamente.

Tabla IV.1.9. Parámetros de validación del método de determinación de los compuestos etilados de mercurio mediante SPME-GC-MIP-AES.

Compuesto	Linealidad / r <sup>(a)</sup>	Repetibilidad / C.V. % <sup>(b)</sup>	LODs / ng.L <sup>-1</sup> <sup>(c)</sup>	LOQs / ng.L <sup>-1</sup> <sup>(d)</sup>
MeHg <sup>+</sup>	0,9972	5,4	2,5	8
Hg <sup>2+</sup>	0,9946	5,7	3,3	11

(a) Calibración a 9 niveles (0-1000 ng.L<sup>-1</sup> especies de mercurio; concentración del patrón interno (TPT): 20 ng.L<sup>-1</sup>); (b) patrón de 100 ng.L<sup>-1</sup> de mercurio (n = 6); (c) definidos para una relación señal/ruido (S/N) de 3; (d) definidos para una relación S/N de 10.

Por lo tanto, el procedimiento optimizado combina un paso de derivatización/microextracción en fase sólida y detección por MIP-AES para la determinación selectiva de compuestos de mercurio al nivel del bajo ppt en sólo 5 min con la fibra de PDMS.

#### **IV.1.2.5. APLICACIÓN A MUESTRAS REALES**

El método de SPME optimizado fue aplicado a muestras reales de agua de río y de agua de mar.

Las concentraciones de las especies de mercurio en las muestras originales estaban por debajo del límite de cuantificación del método propuesto en todas las muestras. Por lo tanto, para estudiar la exactitud del método, se realizó una adición de metilmercurio y mercurio inorgánico

sobre una alícuota de la muestra de agua de río y otra de agua de mar con una concentración de 60 y 100 ng.L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Se estudió el nivel de compuestos encontrados en las muestras adicionadas mediante el procedimiento de adición estándar con patrón interno (TPT). Como puede verse en la tabla IV.1.10 y tabla IV.1.11 los resultados obtenidos estuvieron de acuerdo con las concentraciones añadidas.

Tabla IV.1.10. Resultado del análisis de especies de mercurio (60 ng.L<sup>-1</sup>) en agua de río.

Compuesto	Adición ng.L <sup>-1</sup>	Encontrada ng.L <sup>-1</sup> (a) (b)	Linealidad / r (a)	Pendiente (a)
MeHg <sup>+</sup>	59,7	64,5 ± 6,2	0,9959	0,19
Hg <sup>2+</sup>	61,1	56,5 ± 3,3	0,9928	0,21

(a) Adición estándar 5 niveles (0–180 ng.L<sup>-1</sup> especies de mercurio); concentración del patrón interno (TPT): 20 ng.L<sup>-1</sup>; (b) Valor medio ± desviación estándar (n=3).

Tabla IV.1.11. Resultado del análisis de especies de mercurio (100 ng.L<sup>-1</sup>) en agua de mar.

Compuesto	Adición ng.L <sup>-1</sup>	Encontrada ng.L <sup>-1</sup> (a) (b)	Linealidad / r (a)	Pendiente (a)
MeHg <sup>+</sup>	98,4	103,0 ± 10,4	0,9986	0,04
Hg <sup>2+</sup>	97,2	86,0 ± 11,3	0,9946	0,12

(a) Adición estándar 5 niveles (0–400 ng.L<sup>-1</sup> especies de mercurio); concentración del patrón interno (TPT): 20 ng.L<sup>-1</sup>; (b) Valor medio ± desviación estándar (n=3).

La pendiente de la curva de adición en la determinación de MeHg<sup>+</sup> en agua de mar fue un 21% de la obtenida en la adición sobre agua milli-Q o agua de río. En la determinación de Hg<sup>2+</sup> también se observa una importante reducción de la pendiente, menos intensa pero significativa. La pérdida de sensibilidad se atribuyó a la presencia de sal en el agua de mar.

#### IV.1.2.5.1. Estudio del efecto salino

Con el fin de confirmar la posible causa de la disminución de la señal en el agua de mar frente al agua de río se realizó un estudio sobre la influencia de la presencia de cloruro sódico (NaCl) en la muestra. Para ello, se prepararon muestras de agua milli-Q adicionadas con un contenido de especies de mercurio en un nivel de  $200 \text{ ng.L}^{-1}$  (como mercurio), y se añadieron cantidades variables de NaCl obteniendo concentraciones entre 0 y  $75 \text{ g.L}^{-1}$ , con el fin de determinar su influencia sobre la respuesta.

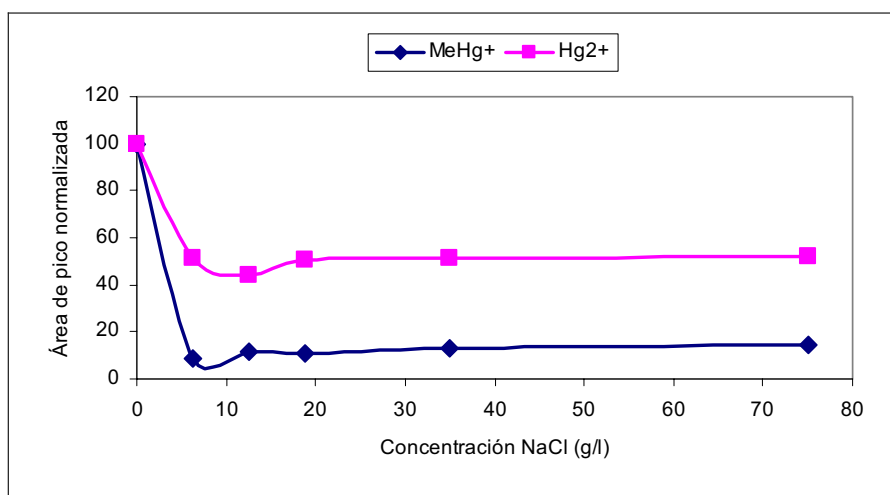


Figura IV.1.9. Perfiles de la influencia de la concentración de NaCl.

La señal de metilmercurio disminuye bruscamente con la adición de sal, obteniendo un 10–20% de la respuesta en agua sin adición de sal. Para el mercurio inorgánico también se produce una disminución de la señal del 40–60% (figura IV.1.9). Se observó la misma disminución de la señal que en las muestras de agua de mar.

Así mismo, se estudió la posibilidad de mejorar la eficiencia de extracción en agua con una concentración salina elevada variando el tiempo (0–30 min) y la temperatura de extracción (23–100°C) usando

muestras de agua milli-Q con una concentración de NaCl 35 g.L<sup>-1</sup> y con un contenido de especies de mercurio de 400 ng.L<sup>-1</sup> (como mercurio).

En la figura IV.1.10 puede verse que a una temperatura de 40–70°C en 10 min se alcanza una eficacia de extracción del 80%. Y a temperaturas mayores cuando aumenta el tiempo de extracción se produce una pérdida de eficacia de extracción.

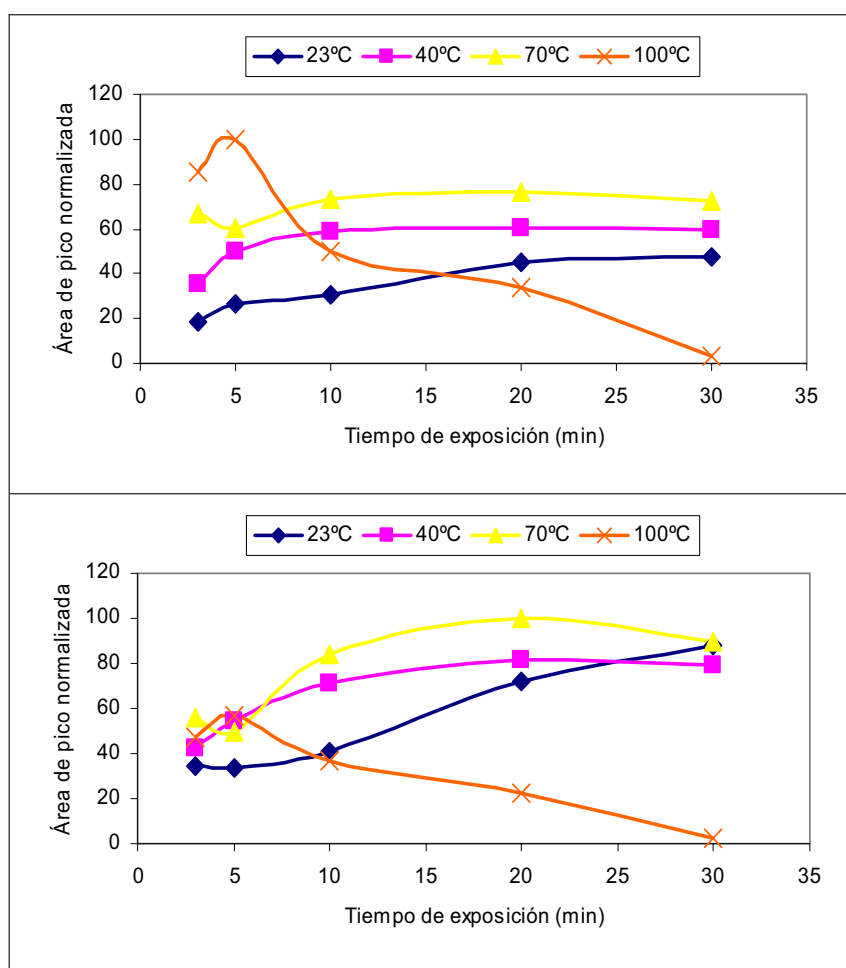


Figura IV.1.10. Cinética de extracción en agua salada a diferentes temperaturas; A, MeHg<sup>+</sup>; B, Hg<sup>2+</sup>.

Por lo tanto, para la extracción de las especies de mercurio en muestras de agua salada es necesario un mayor tiempo de exposición de SPME que en muestras de agua dulce (10 min) además de un calentamiento de la muestra (70°C).

- 
1. Rodríguez, I.; Santamarina, M.; Bollaín, M.H.; Mejuto, M.C.; Cela, R., *J. Chromatogr. A* **774** (1997) 379–387.
  2. Carpinteiro Botana, J.; Rodríguez Pereiro, I.; Cela Torrijos, R., *J. Chromatogr. A* **963** (2002) 195–203.
  3. Carro-Díaz, A.M.; Lorenzo-Ferreira, R.A.; Cela-Torrijos, R., *J. Chromatogr. A* **683** (1994) 245–252.
  4. Gebersmann, C.; Heisterkamp, H.; Adams, .C.; Brökärt, J.A.C., *Anal. Chim. Acta* **350** (1997) 273–285.
  5. Palmieri, H.E.L.; Leonel, L.V., *Fresenius J. Anal. Chem.* **366** (2000) 466–469.
  6. Minganti, V.; Capella, R.; De Pellegrini, R., *Fresenius J. Anal. Chem.* **351** (1995) 471–477.
  7. Lobinski, R.; Dirkx, W.H.R.; Ceulemans, M.; Adams, F.C., *Anal. Chem.* **64** (1992) 159–165.
  8. Tutschku, S.; Mothes, S.; Diltrich, K. *J. Chromatogr. A* **683** (1994) 269–276.
  9. Lobinski, R.; Sidelnikov, V.; Patrushev, Y.; Rodríguez, I.; Wasik, A., *Trends Anal. Chem.* **18** (1999) 449–460.
  10. *Statgraphics Plus V3*, Reference Manual. Manugistics, Rockville MD (1992).
  11. Cai, Y.; Bayona, J.P., *J Chromatogr. A* **696** (1995) 113–122.

12. Moens, L.; de Smaele T.; Dams, R.; van der Broeck, P.; Sandra, P., *Anal. Chem.* **69** (1997) 1604–1611.
13. Dunemann, L.; Hajimiragha, H.; Begerow, J., *Fresenius J. Anal. Chem.* **363** (1999) 466–468.





## IV.2. DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE MERCURIO EN MUESTRAS BIOLÓGICAS Y SEDIMENTOS MEDIANTE MAE-DERIVATIZACIÓN-SPME Y CROMATOGRAFÍA DE GASES CON ESPECTROMETRÍA DE EMISIÓN ATÓMICA

En este estudio se desarrolla metodología analítica para la determinación de metilmercurio y mercurio (II) en muestras biológicas de origen marino y en sedimentos, basándose en la cromatografía de gases acoplada a detección por emisión atómica. La combinación de lixiviación por energía de microondas con un procedimiento de derivatización y SPME antes de la determinación por GC-MIP-AES no requiere consumo de disolvente orgánico y reduce el tiempo de análisis y el número de pasos en la manipulación de la muestra, mejorando además las características cromatográficas.

En primer lugar, se optimizaron las condiciones de derivatización con tetrafenilborato sódico ( $\text{NaBPh}_4$ ) y extracción mediante SPME en espacio de cabeza.

A continuación, se optimizaron las condiciones de lixiviación con energía de microondas, para alcanzar el paso de los analitos de interés de la matriz de la muestra al agente lixivante de manera rápida.

El método optimizado MAE-derivatización/SPME-GC-MIP-AES se validó y aplicó a la determinación de metilmercurio y mercurio inorgánico en muestras biológicas de origen marino y en sedimentos.

## **IV.2.1. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **IV.2.1.1. PATRONES**

Los patrones comerciales usados fueron los siguientes:

Cloruro de metilmercurio ( $\text{MeHg}^+$ ) 98,5% (Merck)

Cloruro de etilmercurio ( $\text{EtHg}^+$ ) 99% (Merck)

Dicloruro de mercurio ( $\text{Hg}^{2+}$ ) 99,5% (Merck)

A partir de estos patrones comerciales se prepararon disoluciones patrón individuales de cada compuesto por pesada de  $1,2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  en metanol o en disolución acuosa de 1%  $\text{HNO}_3$  para mercurio inorgánico. Las disoluciones se guardaron a  $4^\circ\text{C}$  y en oscuridad.

A partir de las disoluciones stock se prepararon patrones de trabajo de  $50 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  y  $0,1 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (como mercurio) para metilmercurio y de  $125 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  y  $0,25 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (como mercurio) para mercurio inorgánico por pesada y dilución en agua milli-Q. Todas las disoluciones se guardaron a  $4^\circ\text{C}$  y en oscuridad.

Finalmente, se prepararon disoluciones de etilmercurio en agua milli-Q de  $50 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $2 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  y  $0,1 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (como mercurio), que se usaron como patrón interno para corregir la variabilidad del proceso de derivatización - extracción.

### **IV.2.1.2. OTRAS DISOLUCIONES**

Las disoluciones de ácido clorhídrico (HCl) y ácido acético (HAc) utilizadas para la lixiviación se prepararon por disolución de HCl del 36% o ácido acético glacial en agua milli-Q. Las disoluciones de hidróxido sódico

(NaOH), para el ajuste del pH, se prepararon por pesada y dilución en agua milli-Q.

La disolución tampón de pH 5 se preparó por dilución de acetato sódico ( $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ ) en agua milli-Q y ajuste a pH 5 con ácido acético glacial.

La disolución del agente derivatizante, tetrafenilborato sódico ( $\text{NaBPh}_4$ ), se preparó en concentración 1% (p/v) en agua milli-Q diariamente.

#### IV.2.1.3. MUESTRAS

Las muestras de **material biológico** empleadas para la optimización del proceso de extracción procedían de un material de referencia certificado (TORT-1). Para el proceso de validación además de TORT-1 se utilizaron otros materiales de referencia certificado como DORM-2, DOLT-2 y CRM 463.

El material biológico de origen marino (hepatopáncreas de langosta) TORT-1 (NRCC) posee un contenido certificado de metilmercurio de  $0,128 \pm 0,014 \text{ mg.kg}^{-1}$  (como Hg) y de mercurio total de  $0,33 \pm 0,06 \text{ mg.kg}^{-1}$  (como Hg).

El material biológico de origen marino (hígado de mielga, *squalus acanthias*) DOLT-2 (NRCC) posee un contenido certificado de metilmercurio de  $0,693 \pm 0,053 \text{ mg.kg}^{-1}$  (como Hg) y de mercurio total de  $2,14 \pm 0,28 \text{ mg.kg}^{-1}$  (como Hg).

El material biológico de origen marino (músculo de mielga, *squalus acanthias*) DORM-2 (NRCC) posee un contenido certificado de

metilmercurio de  $4,47 \pm 0,32$  mg.kg<sup>-1</sup> (como Hg) y de mercurio total de  $4,64 \pm 0,26$  mg.kg<sup>-1</sup> (como Hg).

El material biológico de origen marino (atún) CRM 463 (BCR) posee un contenido certificado de metilmercurio de  $3,04 \pm 0,16$  mg.kg<sup>-1</sup> (como MeHg) y de mercurio total de  $2,85 \pm 0,16$  mg.kg<sup>-1</sup> (como Hg).

Las muestras de **sedimentos** utilizadas para la optimización del proceso de extracción procedían de un material preparado con una adición de metilmercurio de 100 ng.g<sup>-1</sup> y para el proceso de validación se utilizaron materiales de referencia certificados como CRM 580, IAEA-356 y PACS-2.

La muestra de sedimento con adición utilizada durante el proceso de optimización del tratamiento de muestra se preparó con un contenido de metilmercurio de 100 ng.g<sup>-1</sup>. No se adicionó mercurio inorgánico debido a que en pruebas previas se encontró que el sedimento original tenía un alto contenido de éste. Para ello, se tomaron 200 g del sedimento de tamaño de partícula menor de 300 µm y se le añadieron 200 mL de patrón de metilmercurio en metanol. Se removió cada día, para obtener una homogenización completa, hasta la total evaporación del metanol.

El sedimento marino PACS-2 (NRCC) posee un contenido certificado de mercurio total de  $3,04 \pm 0,20$  mg.kg<sup>-1</sup> (como Hg).

El sedimento de estuario CRM 580 (BCR) posee un contenido certificado de metilmercurio de  $0,0755 \pm 0,0037$  mg.kg<sup>-1</sup> (como MeHg) y de mercurio total de  $132 \pm 3$  mg.kg<sup>-1</sup> (como Hg).

El sedimento marino IAEA-356 (IAEA) posee un contenido certificado de metilmercurio de  $0,00546 \pm 0,00038$  mg.kg<sup>-1</sup> (como Hg) y de mercurio total de  $7,62 \pm 0,61$  mg.kg<sup>-1</sup> (como Hg).

#### IV.2.1.4. CONDICIONES INSTRUMENTALES DE MEDIDA

La extracción de las muestras se realizó en un extractor microondas MES 1000 (CEM) equipado con un sistema de detección de disolventes y capaz de extraer simultáneamente 12 muestras en vasos de extracción de Politetrafluoretileno (PTFE) bajo idénticas condiciones de temperatura y presión. Posee un sistema que permite la monitorización y control de las condiciones de presión y temperatura en el interior de los vasos.

La separación de los compuestos fenilados de mercurio se realizó en un cromatógrafo de gases HP 5890 Series II acoplado a un espectrómetro de emisión atómica de plasma inducido por microondas HP 5921A. La adquisición y procesado de datos se llevó a cabo con el software HP 9144 Chemstation. Los compuestos fenilados se separaron en una columna cromatográfica capilar DB-5ms de 30 m de longitud x 0,32 mm diámetro interno (0,25  $\mu\text{m}$  de espesor de fase). Las condiciones experimentales de medida aparecen resumidas en la tabla IV.2.1.

Tabla IV.2.1. Condiciones experimentales de medida del sistema GC-MIP-AES para la determinación de compuestos fenilados de mercurio.

Cromatógrafo de gases (GC)	
Temperatura del inyector	200°C
Modo de Inyección	Splitless
Tiempo de purga	60 s
Relación de split	5:1
Presión en cabeza de columna	20 psi
Flujo de gas portador de helio	3,2 mL/min <sup>-1</sup>
Programa Cromatográfico:	
Temp. Inicial (tiempo inicial)	90 °C (3 min)
Gradiente de temperatura	30 °C.min <sup>-1</sup>
Temp. Final (tiempo final)	270 °C (10 min)

Tabla IV.2.1. Condiciones experimentales de medida del sistema GC-MIP-AES para la determinación de compuestos fenilados de mercurio.

Parámetros del MIP-AES	
Temperatura de la línea de transferencia	280 °C
Temperatura de la cavidad	280 °C
Longitudes de onda de trabajo:	
Carbono	240 nm
Mercurio	254 nm
Flujos de He:	
Flujo de make-up	180 mL.min <sup>-1</sup>
Flujo de purga	205 kPa
Flujo purga de la ferrula	20 mL.min <sup>-1</sup>
Flujo de N <sub>2</sub> para purga del espectrofotómetro	2 mL.min <sup>-1</sup>
Presiones de los gases de reacción:	
H <sub>2</sub>	51 psi
O <sub>2</sub>	29 psi
Tiempo de venteo del disolvente	0-1 min

#### IV.2.1.5. PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Los compuestos de mercurio tienen que ser extraídos de la matriz antes de la SPME. Para ello, se usó un método de lixiviación basándose en un procedimiento asistida por energía microondas<sup>1,2,3,4,5</sup>.

Para la extracción de muestras de **material biológico** se tomaron entre 0,1-0,5 g de la muestra, por pesada exacta en una balanza electrónica de precisión. Se le añadieron 10 mL de HCl 3 mol.L<sup>-1</sup> y se sometió a la energía de microondas en un vaso cerrado a máxima potencia durante 10 min a 100°C.

Para la extracción de muestras de **sedimentos** se tomaron entre 0,5–1 g de la muestra por pesada exacta en una balanza electrónica de precisión, se le añadieron 10 mL de HCl 5 mol.L<sup>-1</sup> y se extrajó en el microondas en un vaso cerrado al 40% de potencia durante 10 min a 77°C.

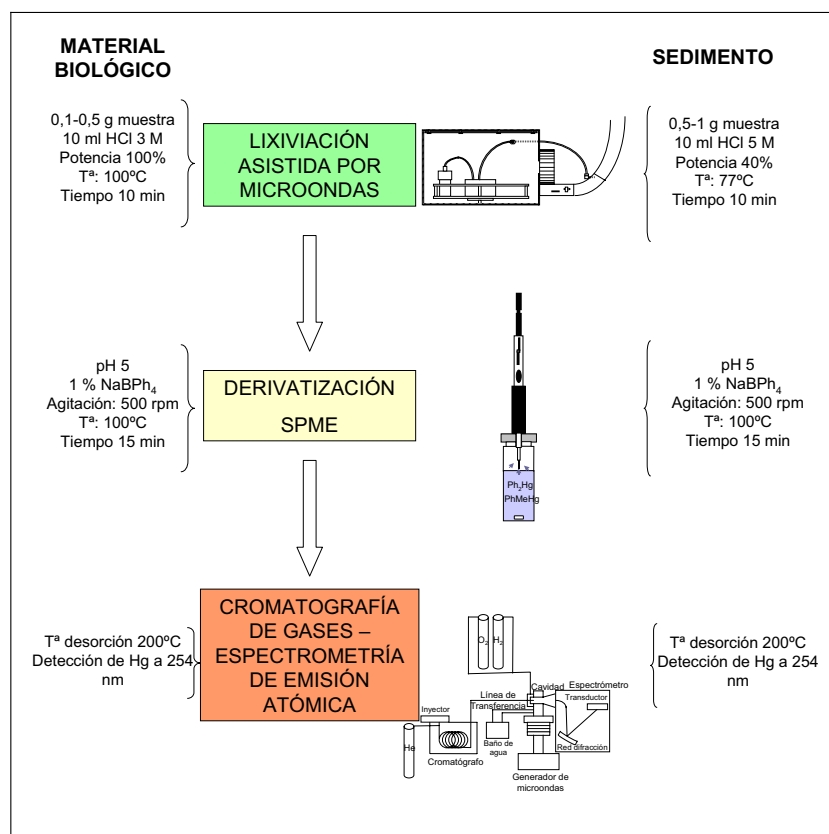


Figura IV.2.1. Esquema de preparación de muestra para la determinación de especies de mercurio en muestras de material biológico y sedimentos.

Para la microextracción fase sólida (SPME), se colocaron 2–5 mL del extracto de la muestra obtenido por MAE en un vial de 22 mL y se ajustó el pH a 5 con disoluciones de NaOH. Posteriormente, se llevó a 9 mL con agua mili-Q y se le añadió 1 mL de tampón. A esta disolución se añadieron 2 mL del agente derivatizante (NaBPh<sub>4</sub> al 1%) y una barra agitadora, y se cerró mediante una cápsula de aluminio y un septum. Se introdujo el vial en

un baño de agua termostatzado a 100°C con una agitación de 500 r.p.m. durante 5 minutos para conseguir que la muestra alcance el equilibrio térmico dentro del vial. Transcurrido este tiempo se introdujo la jeringa de SPME para exponer el recubrimiento (100 µm de PDMS) al espacio de cabeza durante 15 min. Finalmente, la fibra se desorbió en el inyector del cromatógrafo de gases durante 2 min a 200°C.

Para realizar el proceso de calibración se evaluó, con los diferentes niveles de patrones de mercurio considerados, el proceso de derivatización-SPME. Para ello, los patrones fueron añadidos a 9 mL de agua milli-Q ajustada a pH 5 y 1 mL de tampón en un vial de 22 mL. A continuación, se añadieron 2 mL de NaBPh<sub>4</sub> al 1% y la mezcla se sometió al proceso de derivatización-SPME descrito anteriormente. Para la cuantificación, se usó el etilmercurio como patrón interno.

## IV.2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### IV.2.2.1. IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS

Se determinó el tiempo de retención de los compuestos de mercurio inyectando patrones individuales derivatizados con NaBPh<sub>4</sub>.

Tabla IV.2.2. Tiempos de retención de los compuestos de mercurio como especies feniladas.

Compuestos	Tiempo de retención/min
MeHg <sup>+</sup>	4,87
EtHg <sup>+</sup>	5,72
Hg <sup>2+</sup>	8,09



La figura IV.2.2 presenta un cromatograma de un patrón de los compuestos de mercurio de  $1 \text{ ng.mL}^{-1}$  sometido a SPME y la tabla IV.2.2 muestra los tiempos de retención para cada compuesto.

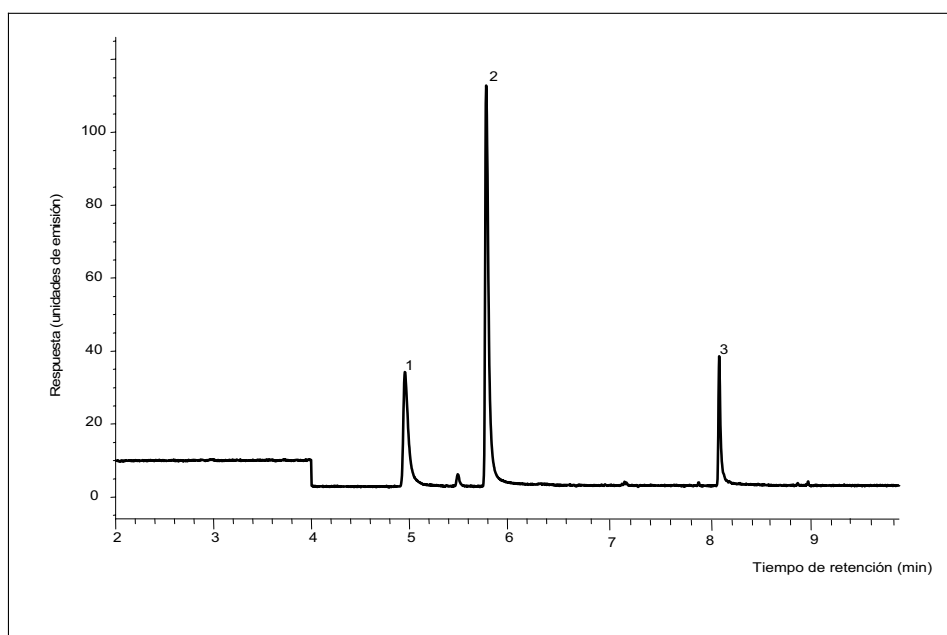


Figura IV.2.2. Cromatograma de GC-MIP-AES (línea de emisión de Hg a 254 nm) para la determinación de los compuestos de mercurio ( $1 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) como especies feniladas (SPME); 1,  $\text{MeHg}^+$ ; 2,  $\text{EtHg}^+$ ; 3,  $\text{Hg}^{2+}$ .

#### IV.2.2.2. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE DERIVATIZACIÓN/SPME

Para la derivatización con tetrafenilborato sodico ( $\text{NaBPh}_4$ )/extracción con SPME se fijaron algunas variables de acuerdo con la bibliografía<sup>6,7</sup> y estudios previos<sup>8</sup>. Se realizó la extracción en espacio de cabeza con agitación y se evaluaron los efectos de la naturaleza de la fase de la fibra de SPME, pH, tiempo y temperatura de muestreo sobre la extracción de los compuestos.

El tipo de fibra se escoge en función del analito a determinar teniendo en cuenta que las fases estacionarias deben poseer gran afinidad hacia los compuestos. En este trabajo, se estudiaron dos tipos de fibras: PDMS (polidimetilsiloxano) de 100  $\mu\text{m}$  de espesor y PDMS/DVB (polidimetilsiloxano/ divinilbenceno) de 65  $\mu\text{m}$  de espesor. Ambos tipos de fibras se acondicionaron antes de su uso por calentamiento en el inyector del cromatógrafo de gases, 30 min a 250°C para la fibra de PDMS y 30 min a 250°C para la fibra de PDMS/DVB.

Como puede verse en el estudio comparativo de la figura IV.2.3, realizado utilizando una disolución de 1  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  para cada compuesto, con la fibra de PDMS se obtuvo una buena señal para todos los compuestos tras la derivatización con  $\text{NaBPh}_4$  a especies volátiles. Con la fibra de PDMS/DVB se obtuvo una menor sensibilidad para mercurio y etilmercurio, y no aparece la señal del mercurio inorgánico tras la derivatización.

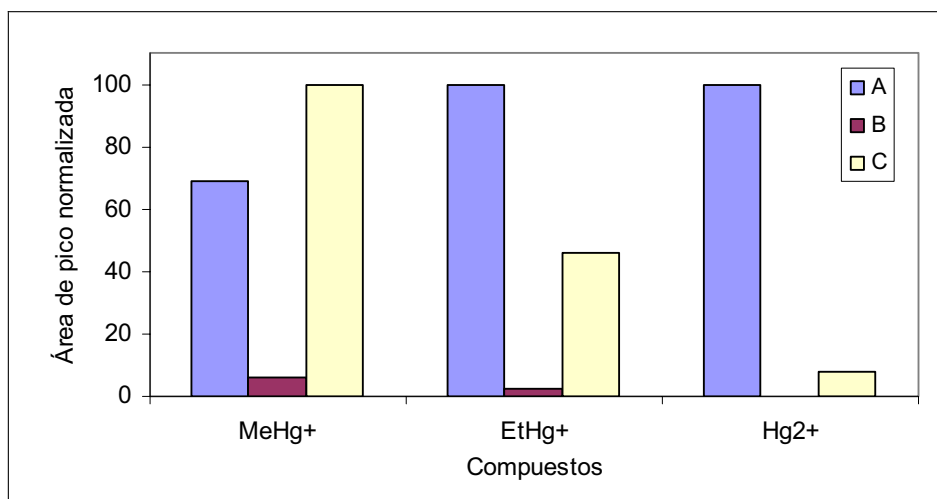


Figura IV.2.3. Comparación de la respuesta obtenida por GC-MIP-AES de las especies de mercurio (1  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) en diferentes condiciones de derivatización/SPME: A, fenilación/extracción con fibra de PDMS; B, fenilación/extracción con fibra PDMS/DVB; C, extracción con fibra PDMS/DVB y posterior fenilación.

Como alternativa, se realizó la microextracción en fase sólida de los analitos con la fibra PDMS/DVB y posterior derivatización por inmersión de la fibra en el agente derivatizante obteniendo mejor sensibilidad que con la derivatización/extracción simultánea con esta fibra, es probable que sea debido a la polaridad que presenta la fase PDMS/DVB. La sensibilidad disminuye en la serie MeHg<sup>+</sup>/EtHg<sup>+</sup>/Hg<sup>2+</sup>. Por lo tanto, se decidió utilizar la fibra de PDMS.

La influencia del pH, tiempo y temperatura de muestreo sobre el rendimiento de la microextracción se estudió, utilizando el paquete estadístico Nemrod<sup>9</sup>, mediante un diseño experimental central compuesto, que contiene un diseño factorial 2<sup>3</sup> completo, seis puntos de estrella más dos puntos centrales, es decir, un total de 16 experiencias.

Tabla IV.2.3. Dominio experimental de los factores seleccionados en el diseño experimental central compuesto para la optimización del proceso de SPME.

Factor	Nivel - $\alpha$ (-1,68)	Nivel Bajo (-1)	Nivel Medio (0)	Nivel Alto (+1)	Nivel + $\alpha$ (+1,68)	Unidades
pH	4	5	6	7	8	
Temperatura	60	68	80	92	100	°C
Tiempo	3	8	15	22	27	min

El pH se consideró para el diseño en el intervalo entre 4 y 8 que está dentro del rango de equilibrio de la fibra de PDMS<sup>10</sup> (2 y 10) y del rango óptimo de derivatización con NaBPh<sub>4</sub> (2 y 6). La temperatura y el tiempo de exposición se consideraron en función de un trabajo anterior<sup>8</sup> donde el óptimo se estableció con 70°C y 27 min, buscando una disminución en el tiempo de exposición, para ello, se estudió la temperatura entre 60 y 100°C y el tiempo entre 3 y 27 min. La tabla IV.2.3 muestra el dominio

experimental considerado para los factores estudiados en el diseño de experiencias.

Los experimentos se realizaron con material biológico (TORT-1) realizando las extracciones con energía de microondas como se indica en el apartado de material y métodos (apartado IV.2.1.5) y realizando la derivatización/SPME siguiendo la matriz de experiencias aleatoria que se muestra en la tabla IV.2.4.

Tabla IV.2.4. Matriz de experiencias y respuestas obtenidas para las especies de mercurio del diseño experimental central compuesto para la optimización de las condiciones de SPME.

Matriz de experiencias aleatoria				Respuestas (cuentas de área)	
Nº Exp.	pH	Temperatura	Tiempo	MeHg <sup>+</sup>	Hg <sup>2+</sup>
1	5	68	8	65,3	0,0
2	7	68	8	80,7	0,0
3	5	92	8	87,7	65,9
4	7	92	8	101,1	77,1
5	5	68	22	78,7	31,4
6	7	68	22	100,1	9,5
7	5	92	22	85,1	240,9
8	7	92	22	63,5	141,8
9	4	80	15	71,0	153,7
10	8	80	15	99,9	104,8
11	6	60	15	61,6	31,6
12	6	100	15	97,8	159,2
13	6	80	3	66,3	0,0
14	6	80	27	84,4	234,1
15	6	80	15	73,5	93,4
16	6	80	15	68,9	88,3

Se estudió la influencia de los factores y las interacciones sobre la respuesta mediante el gráfico Lenth (figura IV.2.4), según la longitud

(proporcional al efecto estimado) y sentido (indicativo del signo del efecto) de las barras de la gráfica. En el caso de metilmercurio, los tres factores muestran una influencia positiva sobre el rendimiento pero sin alcanzar el nivel de significación estadística, siendo el pH y la temperatura de extracción los más importantes. Para el mercurio inorgánico, la temperatura y el tiempo de extracción o exposición presentan un efecto positivo y estadísticamente significativo, mientras el pH tiene un efecto negativo y no llega al nivel de significación.

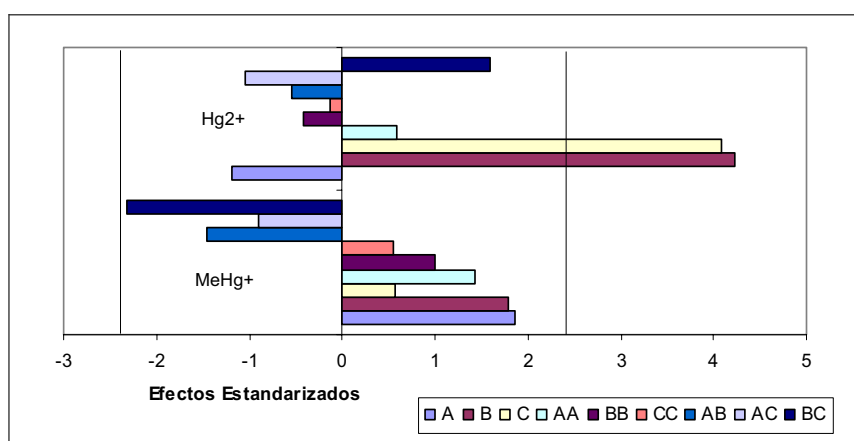


Figura IV.2.4. Gráfico Lenth de efectos principales e interacciones estandarizados del diseño experimental central compuesto. Factores: A, pH; B, temperatura de exposición; C, tiempo de exposición; AA, BB, CC, AB, AC y BC, interacciones entre los factores indicados.

La interacción más importante para ambos compuestos es la existente entre la temperatura y el tiempo de extracción (BC). Esta interacción se puede estudiar mediante las superficies de respuesta (figura IV.2.5), donde se muestra la respuesta cromatográfica en función de los dos factores estudiados (temperatura y tiempo de extracción) mientras el otro factor se mantiene en el centro del dominio (pH 6).

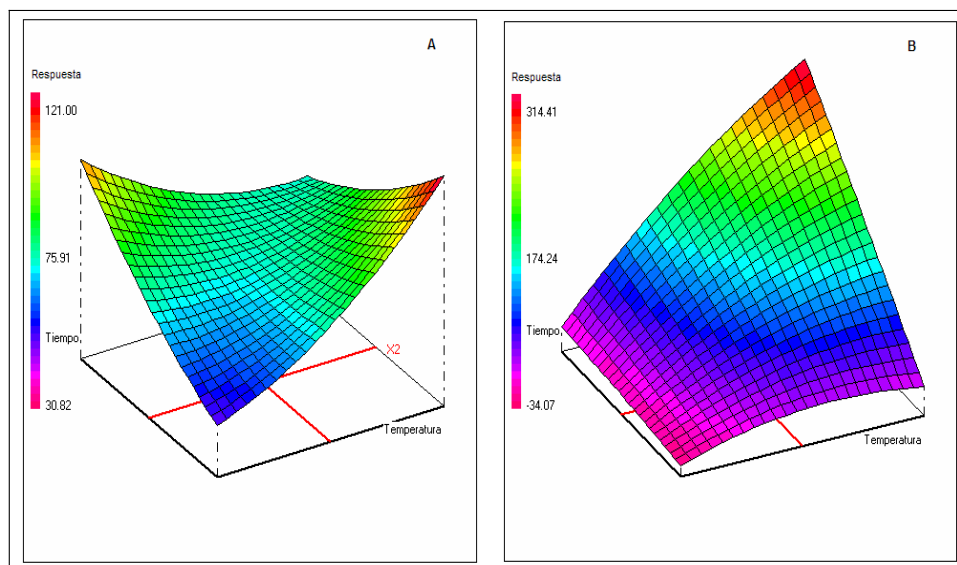


Figura IV.2.5. Superficie de respuesta de la temperatura de extracción frente al tiempo de extracción; A, metilmercurio; B, mercurio inorgánico.

En estas superficies (figura IV.2.5) se muestra que para el metilmercurio las mejores condiciones se obtienen cuando la extracción se realiza a temperatura baja con un tiempo de exposición alto o a temperatura alta con un tiempo de exposición bajo, mientras que para el mercurio inorgánico las mejores condiciones son realizando la extracción a temperatura alta durante un tiempo de exposición elevado.

El diseño experimental se aplicó en combinación con la función de deseabilidad para la optimización de SPME de los compuestos fenilados. Las respuestas de  $\text{MeHg}^+$  y  $\text{Hg}^{2+}$  se usaron en una optimización multicriterio mediante la utilización de una función de deseabilidad global para encontrar las condiciones óptimas simultáneas para el proceso de derivatización y extracción.

En las funciones de deseabilidad individual para cada compuesto, como puede verse en la figura IV.2.6, la diana o centro indica donde se

encuentra el óptimo. Para  $\text{MeHg}^+$  la función de deseabilidad individual empleada es de tipo unilateral izquierda, se busca la maximización de la respuesta y, en el caso de  $\text{Hg}^{2+}$  es de tipo bilateral, con limitaciones a ambos lados del centro, debido a que se obtuvieron recuperaciones más altas del 100% en algunos casos con el material TORT-1.

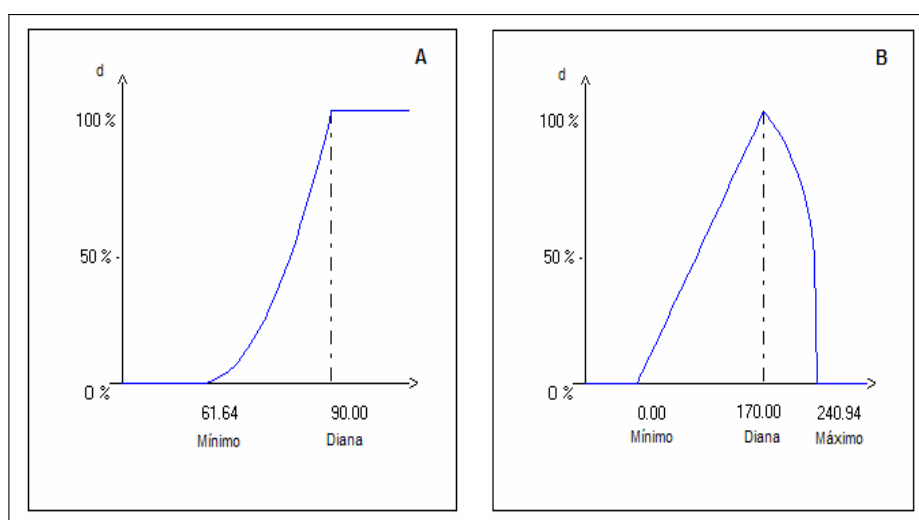


Figura IV.2.6. Funciones de deseabilidad individual para la optimización de SPME; A, metilmercurio; B, mercurio inorgánico.

Las representaciones bidimensionales de la deseabilidad global se muestran en la figura IV.2.7, donde las curvas de isorrespuesta están marcadas con valores en tanto por uno que refleja las zonas de trabajo más adecuadas (alrededor de 1) sin salir del campo experimental esférico (indicado con una circunferencia) que han sido señaladas con una flecha.

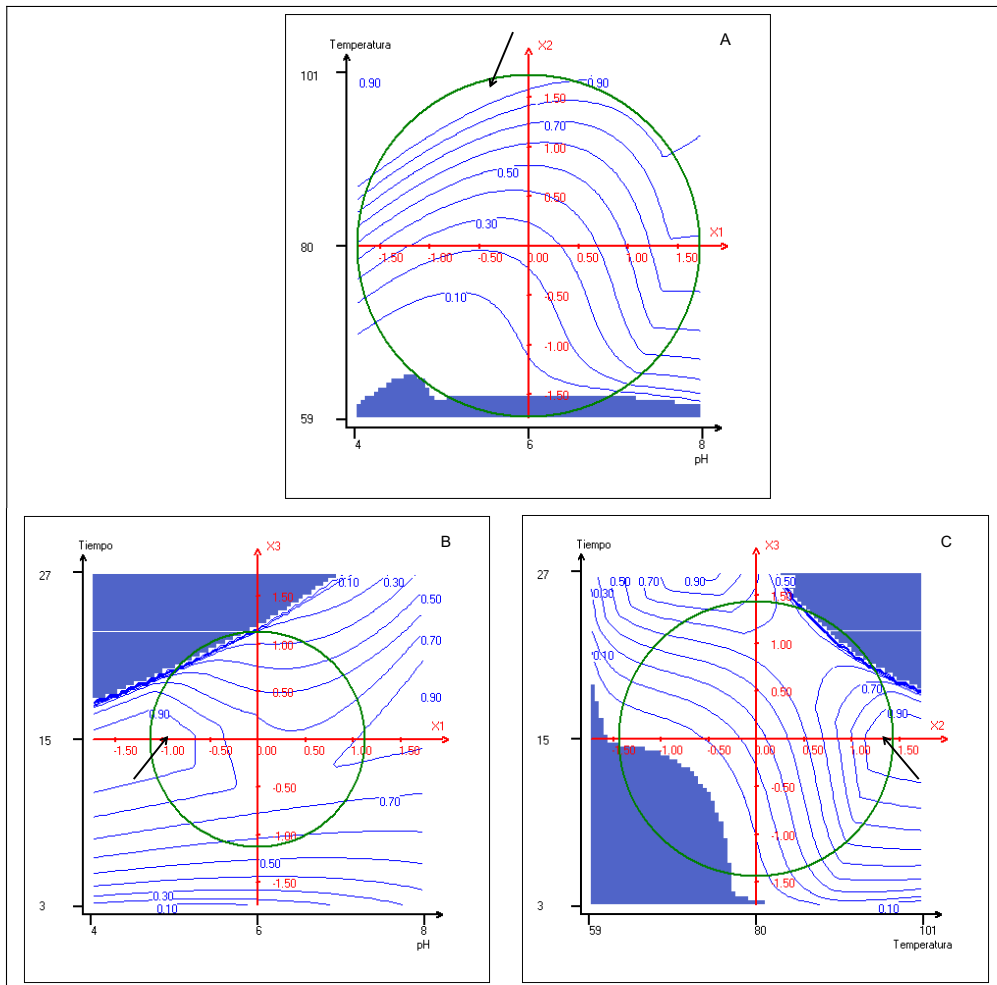


Figura IV.2.7. Funciones de deseabilidad global bidimensionales para la optimización de SPME; A, temperatura frente a pH; B, tiempo frente a pH; C, tiempo frente a temperatura.

La función de deseabilidad combinada predijo las condiciones de SPME óptimas (figura IV.2.7) en las cercanías de pH 5, temperatura de extracción 100°C y tiempo de exposición de 15 min. Estas condiciones optimizadas se utilizaron para la realización de SPME sobre los extractos tanto de material biológico como de sedimentos.



#### IV.2.2.3. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE LIXIVIACIÓN

Las condiciones de lixiviación para muestras de material biológico se adoptaron de un trabajo anterior desarrollado en el laboratorio<sup>1</sup>, utilizándose como agente lixivante 10 mL de HCl 3 mol.L<sup>-1</sup>. La lixiviación se realizó con energía de microondas a máxima potencia (100%) a 100°C durante 10 min.

Las condiciones de lixiviación para muestras de sedimentos fueron optimizadas usando una muestra de sedimentos con adición que se preparó en el laboratorio, según se describe en el apartado IV.2.1.3. Antes de su uso se estudió la homogeneidad del sedimento tomando diferentes cantidades entre 0,1 y 2 g, realizando la extracción por triplicado y calculando el coeficiente de variación de las respuestas obtenidas. Como puede verse en la figura IV.3.3, se puede considerar que el sedimento es homogéneo para tamaños de muestra a partir de 1 g, ya que los coeficientes de variación obtenidos son inferiores al 10%.

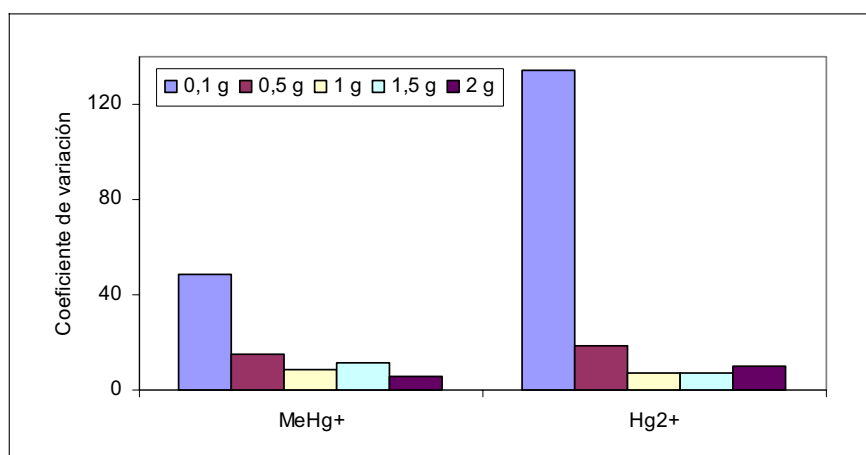


Figura IV.2.8. Perfiles de los coeficientes de variación (%) con el tamaño de muestra (0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 g) en sedimentos para MeHg<sup>+</sup> y Hg<sup>2+</sup>.

Se evaluaron los factores que afectan a la lixiviación asistida por microondas, estudiando los efectos del tiempo y temperatura de lixiviación, tipo y concentración de ácido y la potencia del microondas mediante un diseño experimental factorial fraccionado  $2^{5-1}$ , es decir, mediante 16 experiencias, utilizando el paquete estadístico Nemrod<sup>9</sup>.

Los niveles de los factores tiempo y la temperatura de lixiviación se eligieron en función de estudios anteriores<sup>3</sup> entre 2–15 min y 60–120°C, respectivamente. También se consideró la potencia de MW, entre 40% y 100%. Asimismo se estudió el tipo de ácido que se debe utilizar en la lixiviación, se consideró un ácido fuerte (ácido clorhídrico) y uno débil (ácido acético) desde concentraciones bajas (0,5 mol.L<sup>-1</sup>) a altas (6 mol.L<sup>-1</sup>). En la tabla IV.2.5 se muestra el dominio experimental evaluado con el diseño factorial fraccionado  $2^{5-1}$ .

Tabla IV.2.5. Dominio experimental de los factores seleccionados en el diseño experimental factorial fraccionado  $2^{5-1}$  para la optimización del proceso de lixiviación.

<b>Factor</b>	<b>Nivel Bajo (-1)</b>	<b>Nivel Alto (+1)</b>	<b>Unidades</b>
Tiempo	2	15	min
Temperatura	60	120	°C
Ácido	HCl	HAc	
Concentración de ácido	0,5	6	mol.L <sup>-1</sup>
Potencia	40	100	%

Los experimentos se realizaron con una muestra de sedimentos con adición tomando 1 g y adicionando 10 mL del agente lixivante siguiendo la matriz de experiencias aleatoria que se muestra en la tabla IV.2.6. Tras la lixiviación se realizó la preconcentración del extracto de microondas mediante SPME en espacio de cabeza a pH 5 con una agitación de 500

r.p.m. a 100°C durante 15 min usando una fibra de PDMS, condiciones optimizadas en el apartado IV.2.2.2.

Tabla IV.2.6. Matriz de experiencias y respuestas obtenidas para las especies de mercurio del diseño experimental factorial fraccionado  $2^{5-1}$  para la optimización de las condiciones de lixiviación.

N° Exp	Matriz de experiencias aleatoria					Respuestas (cuentas de área)	
	Tiempo	T <sup>a</sup>	Ácido	Concentración	Potencia	MeHg <sup>+</sup>	Hg <sup>2+</sup>
1	2	60	HCl	0,5	100	424,2	2475,2
2	15	60	HCl	0,5	40	645,8	2486,1
3	2	120	HCl	0,5	40	633,1	1298,1
4	15	120	HCl	0,5	100	84,3	4,2
5	2	60	HAc	0,5	40	46,7	124,8
6	15	60	HAc	0,5	100	46,7	102,2
7	2	120	HAc	0,5	100	82,0	356,7
8	15	120	HAc	0,5	40	70,8	61,1
9	2	60	HCl	6,0	40	1079,5	59136,0
10	15	60	HCl	6,0	100	1077,5	46076,6
11	2	120	HCl	6,0	100	38,8	39665,1
12	15	120	HCl	6,0	40	31,9	26926,4
13	2	60	HAc	6,0	100	138,8	81,3
14	15	60	HAc	6,0	40	204,5	727,3
15	2	120	HAc	6,0	40	269,7	210,3
16	15	120	HAc	6,0	100	562,5	116,2

Se estudió la influencia de los factores y las interacciones sobre la respuesta, tal como se muestra en la figura IV.2.9, para metilmercurio; Ningún factor es estadísticamente significativo al nivel de confianza fijado (95 %), siendo la temperatura de extracción y el tipo de ácido los que parecen más importantes. Para mercurio inorgánico, el tipo y la concentración de ácido presentan un efecto estadísticamente significativo, en el caso de la concentración un efecto positivo y el tipo de ácido un

efecto negativo, que indica una clara preferencia por ácidos fuertes como en este caso el ácido clorhídrico.

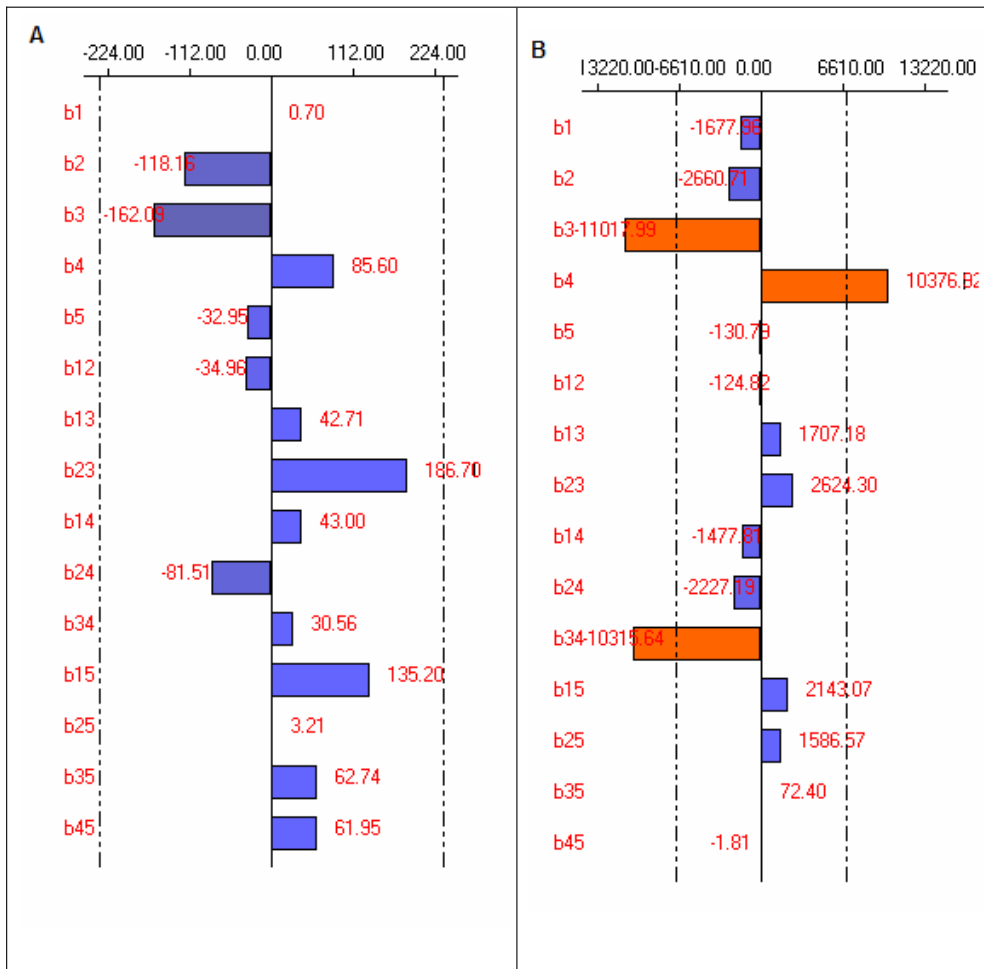


Figura IV.2.9. Gráfico Lenth de efectos principales e interacciones del diseño factorial fraccionado  $2^{5-1}$  para: A, MeHg<sup>+</sup>; B, Hg<sup>2+</sup>. Factores: 1, Tiempo; 2, Temperatura; 3, Tipo de ácido; 4, Concentración de ácido; 5, Potencia; 12,13,23,14,24,34,15,25,35 y 45, interacciones entre los factores indicados.

Para MeHg<sup>+</sup> ninguna interacción es estadísticamente significativa, pero la interacción temperatura–tipo de ácido (2–3) presenta un efecto positivo y está muy cerca del nivel de significación. Para Hg<sup>2+</sup> la interacción concentración de ácido–tipo de ácido (3–4) es estadísticamente significativa

presentando un efecto negativo. Estas interacciones se pueden estudiar de una manera gráfica, en los gráficos de interacciones (figura IV.2.10).

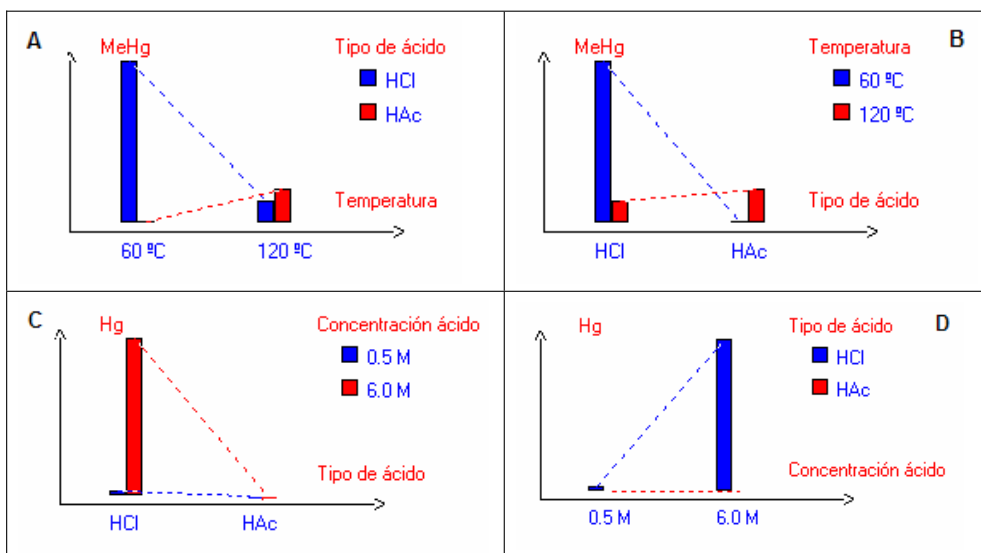


Figura IV.2.10. Gráficos de interacciones del diseño factorial fraccionado  $2^{5-1}$  para: A y B MeHg<sup>+</sup> para la interacción temperatura-tipo de ácido; C y D, Hg<sup>2+</sup> para la interacción tipo-concentración de ácido.

Podemos concluir que el tipo de ácido para ambos compuestos tiene una influencia claramente negativa, es decir debe fijarse en el nivel bajo (HCl), por lo tanto las siguientes experiencias se realizaran con ácido clorhídrico. En los gráficos de interacciones mostrados en la figura IV.2.10, se puede observar que para MeHg<sup>+</sup> si se usa HCl la mayor respuesta se obtiene a temperatura baja, y para Hg<sup>2+</sup> el HCl produce una mayor eficiencia de extracción a elevada concentración (6 mol.L<sup>-1</sup>).

La potencia de MAE no tiene apenas influencia sobre los compuestos estudiados, se decidió fijar en el nivel bajo porque según la bibliografía<sup>11</sup> a una potencia elevada, independientemente del tiempo, se puede producir la ruptura de los enlaces Hg-C. Por lo tanto se fija al 40%.

Los factores tiempo, temperatura y concentración del ácido se estudiaron de forma pormenorizada mediante un diseño de superficie de respuesta, un diseño central compuesto con tres puntos centrales, utilizando el paquete estadístico Nemrod<sup>9</sup>. Los niveles de los factores se muestran en la tabla IV.2.7. La temperatura de extracción se acotó por el nivel máximo (100°C) debido a que para ambos compuestos tiene un efecto negativo y a la temperatura máxima se produce una presión muy elevada en el vaso de microondas.

Tabla IV.2.7. Dominio experimental de los factores seleccionados en el diseño experimental central compuesto para la optimización de las condiciones de MAE.

<b>Factor</b>	<b>Nivel <math>-\alpha</math> (-1,68)</b>	<b>Nivel Bajo (-1)</b>	<b>Nivel Medio (0)</b>	<b>Nivel Alto (+1)</b>	<b>Nivel <math>+\alpha</math> (+1,68)</b>	<b>Unid.</b>
Tiempo	1	3	6	9	11	min
Temperatura	50	60	75	90	100	°C
Concentración	0,6	1,8	3,5	5,2	6,4	mol.L <sup>-1</sup>

Los experimentos se realizaron de igual manera que en el cribado, con una muestra de sedimentos con adición tomando 1 g y adicionando 10 mL de ácido clorhídrico siguiendo la matriz de experiencias aleatoria que se muestra en la tabla IV.2.8. Así mismo, en esta tabla se incluyen las respuestas, expresadas en cuentas de área, obtenidas para MeHg<sup>+</sup> y Hg<sup>2+</sup>.

Tabla IV.2.8. Matriz de experiencias y respuestas obtenidas para las especies de mercurio del diseño experimental central compuesto con 3 puntos centrales.

Matriz de experiencias aleatoria				Respuestas (cuentas de área)	
Nº Exp.	Tiempo	Tª	Concentración	MeHg <sup>+</sup>	Hg <sup>2+</sup>
1	3	60	1,8	2153,8	32298,3
2	9	60	1,8	937,2	28146,1
3	3	90	1,8	1230,8	24187,7
4	9	90	1,8	1138,8	30977,2
5	3	60	5,2	1281,3	41126,8
6	9	60	5,2	2804,1	53718,0
7	3	90	5,2	948,1	37598,8
8	9	90	5,2	1108,8	48319,8
9	1	75	3,5	1791,8	42338,0
10	11	75	3,5	1796,4	43226,6
11	6	50	3,5	1645,6	39057,2
12	6	100	3,5	656,4	32877,2
13	6	75	0,6	1370,1	7312,4
14	6	75	6,4	985,7	26962,8
15	6	75	3,5	2355,0	37995,9
16	6	75	3,5	1310,1	19269,2
17	6	75	3,5	1558,6	38592,4

En la estimación de coeficientes (tabla IV.2.9) para MeHg<sup>+</sup> se puede observar que el coeficiente b2 del modelo, asociado a la temperatura de extracción, tiene una influencia negativa y es estadísticamente significativo, mientras que para Hg<sup>2+</sup> se puede observar que el coeficiente b3 del modelo, asociado a la concentración de ácido, es estadísticamente significativo con un efecto positivo.

Tabla IV.2.9. Estimaciones de los coeficientes para las especies de mercurio del diseño experimental central compuesto con 3 puntos centrales.

Coeficiente	MeHg <sup>+</sup>			Hg <sup>2+</sup>		
	Valor del coeficiente	t exp.	Significación (%)	Valor del coeficiente	t exp.	Significación (%)
b0	1734,90	6,41	0,0471***	31624,90	7,34	0,0229***
b1	28,02	0,22	82,6	2009,53	0,99	35,6
b2	-323,17	-2,54	377*	-1801,23	-0,89	40,6
b3	2,58	0,02	98,2	7190,66	3,55	0,933**
b11	40,51	0,29	77,6	4957,45	2,23	6,0
b22	-186,86	-1,33	22,3	2547,97	1,14	29,1
b33	-177,35	-1,27	24,5	-4109,25	-1,85	10,5
b12	-29,69	-0,18	85,7	1133,94	0,43	68,2
b13	374,01	2,25	5,8	2584,36	0,98	36,3
b23	-163,39	-0,98	36,0	-455,84	-0,17	86,2

1, tiempo; 2, temperatura; 3, concentración; 11,22,33,12,13 y 23 interacciones. El signo del coeficiente indica la tendencia del efecto. \* significación estadística al 95%.

La interacción más importante para metilmercurio es la existente entre el tiempo de extracción y la concentración del ácido (asociada al coeficiente b13). En la figura IV.2.11 se muestra la respuesta cromatográfica en función de esos factores estudiados (tiempo y concentración) mientras la temperatura se mantiene en el nivel 0 correspondiente con el centro del dominio (temperatura 75°C), las mejores respuestas observadas se obtienen a concentración y tiempo en nivel alto.



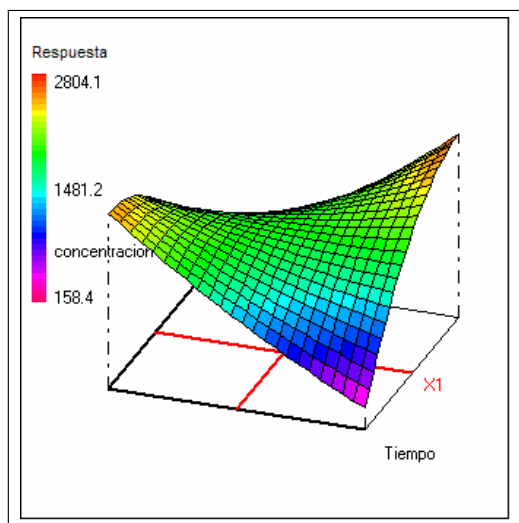


Figura IV.2.11. Superficie de respuesta del tiempo de extracción frente a la concentración del ácido para metilmercurio.

Para alcanzar unas condiciones óptimas de extracción para ambos compuestos de forma simultánea se busca una solución de compromiso mediante una optimización multicriterio, como es la función de deseabilidad. Se eligieron funciones de deseabilidad individuales unilaterales por la izquierda buscando la maximización de la respuesta (figura IV.2.12).

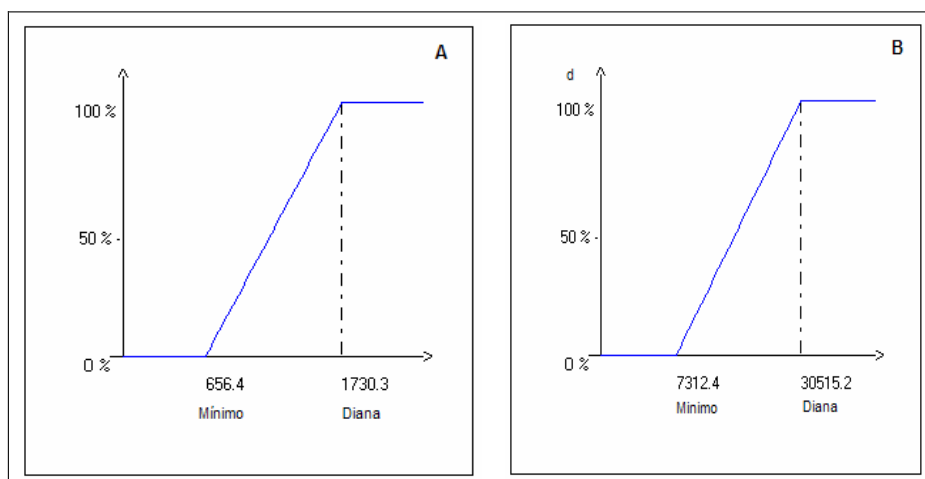


Figura IV.2.12. Funciones de deseabilidad individual para la optimización de las condiciones de MAE; A, metilmercurio; B, mercurio inorgánico.

Las representaciones bidimensionales de la deseabilidad global de la figura IV.3.8, muestra las curvas de isorrespuesta marcadas con valores en tanto por uno. La cercanía al 1 refleja las condiciones más adecuadas para realizar la lixiviación, en este caso se indican con una flecha, sin salir del campo experimental esférico señalado mediante una circunferencia.

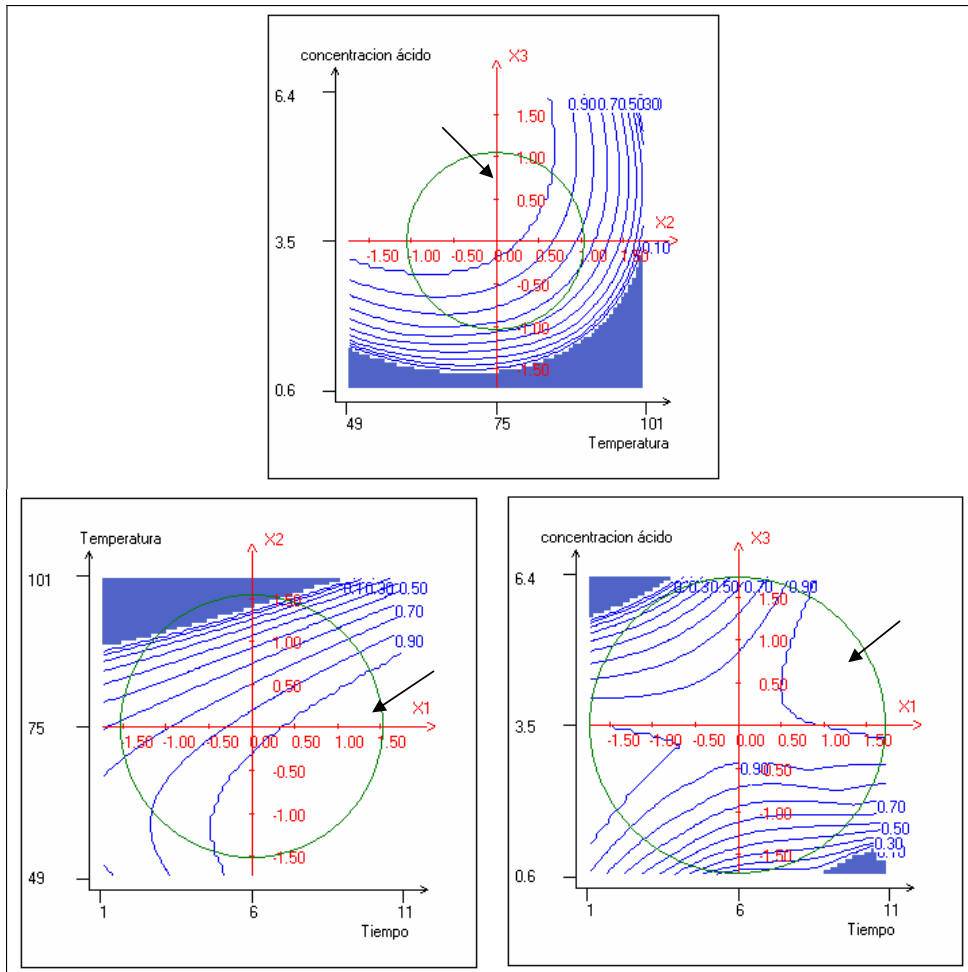


Figura IV.2.13. Funciones de deseabilidad global bidimensionales para la optimización de las condiciones de MAE.

La función de deseabilidad combinada predijo las condiciones de lixiviación con energía de microondas óptimas, como se observa en la

figura IV.2.13 con ácido clorhídrico 5 mol.L<sup>-1</sup>, a una temperatura de 77°C durante 10 minutos.

Por lo tanto, las condiciones de lixiviación optimizadas para muestras de sedimentos fijaron como agente lixivante 10 mL de HCl 5 mol.L<sup>-1</sup> y la extracción con energía de microondas al 40% de potencia durante 10 min a 77°C.

#### IV.2.2.4. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

En las condiciones optimizadas se estudió la linealidad, precisión y límites de detección y cuantificación, tanto para material biológico como para sedimentos. Para ambas matrices se construyeron las curvas de calibrado usando tres procedimientos: calibrado externo, patrón interno (EtHg<sup>+</sup>) y adición estándar.

Para la validación del método analítico optimizado para el análisis de muestras de **material biológico** se construyeron las curvas de calibrado utilizando cinco niveles entre 0 y 3 ng.mL<sup>-1</sup> por triplicado mediante la dilución apropiada de los patrones de MeHg<sup>+</sup>. De manera semejante, para Hg<sup>2+</sup> se trabajó con niveles de patrones entre 0 y 10 ng.mL<sup>-1</sup>. Cuando se preparó el calibrado con patrón interno se utilizó el EtHg<sup>+</sup> que fue añadido a nivel de 0,8 ng.mL<sup>-1</sup>, y en el calibrado por adición se utilizó como muestra el material de referencia TORT-1. Los coeficientes de correlación presentan valores entre el 0,986 y 0,999 (tabla IV.2.10).

Tabla IV.2.10. Parámetros de calibración de la determinación de los compuestos de mercurio en material biológico.

Compuesto	Calibrado Externo/ $r$ (a)	Calibrado con Patrón interno/ $r$ (a)(b)	Adición estándar/ $r$ (a)(c)	Adición estándar con patrón interno/ $r$ (a)(b)(c)
MeHg <sup>+</sup>	0,9991	0,9997	0,9904	0,9993
Hg <sup>2+</sup>	0,9977	0,9979	0,9861	0,9949

(a) Calibración a 5 niveles (0–3 ng.mL<sup>-1</sup> metilmercurio y 0–10 ng.mL<sup>-1</sup> mercurio inorgánico); (b) Con EtHg<sup>+</sup> como patrón interno (concentración del patrón interno: 0,8 ng.mL<sup>-1</sup>); (c) Adición sobre el material de referencia TORT-1.

Para muestras de **sedimentos** se construyen las curvas de calibrado utilizando 5 niveles por triplicado. Para MeHg<sup>+</sup> se trabajó con niveles entre 0 y 5 ng.mL<sup>-1</sup> y para Hg<sup>2+</sup> entre 0 y 100 ng.mL<sup>-1</sup>, debido a la mayor concentración de Hg<sup>2+</sup> presente en los sedimentos. El patrón interno, EtHg<sup>+</sup>, también se añadió en el nivel de 1 ng.mL<sup>-1</sup>. En el calibrado mediante el método de adición se utilizó muestra de material de referencia certificado CRM 580. Los coeficientes de correlación obtenidos presentan valores entre el 0,994 y 0,999 (tabla IV.3.8), para todos los métodos.

Tabla IV.2.11. Parámetros de calibración de la determinación de los compuestos de mercurio en sedimentos.

Compuesto	Calibrado Externo/ $r$ (a)	Calibrado con Patrón interno/ $r$ (a)(b)	Adición estándar/ $r$ (a)(c)	Adición estándar con patrón interno/ $r$ (a)(b)(c)
MeHg <sup>+</sup>	0,9967	0,9971	0,9939	0,9979
Hg <sup>2+</sup>	0,9972	0,9985	0,9963	0,9984

(a) Calibración a 5 niveles (0–5 ng.mL<sup>-1</sup> metilmercurio y 0–100 ng.mL<sup>-1</sup> mercurio inorgánico); (b) Con EtHg<sup>+</sup> como patrón interno (concentración del patrón interno: 1 ng.mL<sup>-1</sup>); (c) Adición sobre el material de referencia CRM 580.

La linealidad obtenida es buena, menos para el método de adición, para el que el ajuste es pobre debido a la variación producida en la etapa de preparación de muestra pero el uso de patrón interno lo puede corregir.

Se decidió cuantificar en ambos casos (muestras de material biológico y sedimentos) utilizando calibración con patrón interno, debido a que a pesar de que existía un importante efecto matriz éste se corregía de manera satisfactoria mediante el uso de patrón interno y desde el punto de vista práctico el análisis resulta más sencillo.

En la tabla IV.2.12 se muestran otros parámetros del método. La repetibilidad y la reproducibilidad del proceso, expresadas como coeficientes de variación (C.V.), se evaluaron mediante cinco análisis de los materiales de referencia TORT-1 y CRM 580, muestras de material biológico y sedimentos respectivamente, realizadas el mismo día, y otros cinco realizados en diferentes días y estuvieron comprendidas entre 6,7 y 16,3% para material biológico y entre 8,4 y 15,4 para sedimentos.

Se obtuvieron unos límites de detección (calculados como tres veces la desviación estándar del estimado en el análisis de regresión dividido por la pendiente de la recta de calibrado) de 2,4 y 17,2 ng.g<sup>-1</sup>, tomando 1 g de muestra, para metilmercurio y mercurio inorgánico, respectivamente.

Tabla IV.2.12. Parámetros de validación del método de determinación de los compuestos de mercurio.

Compuesto	Material Biológico		Sedimentos		LODs / ng.g <sup>-1</sup> (e)	LOQs / ng.g <sup>-1</sup> (e)
	Repeti. / C.V. % (a)	Repro. / C.V. % (b)	Repeti. / C.V. % (c)	Repro. / C.V. % (d)		
MeHg <sup>+</sup>	6,7	8,6	8,4	12,1	2,4	4,8
Hg <sup>2+</sup>	12,9	16,3	10,1	15,4	17,2	34,4

(a) material de referencia TORT-1 (n=5) en el mismo día; (b) material de referencia TORT-1 (n=5) en días consecutivos; (c) material de referencia CRM 580 (n=5); (d) material de referencia CRM 580 (n=5); (e) definidos como 3 y 10 veces la desviación estándar del estimado en el análisis de regresión dividido por la pendiente de la recta de calibrado, para 1 g de muestra.

El estudio mostró unos valores de linealidad, precisión y límites de detección adecuados para el análisis de compuestos de mercurio en muestras biológicas y sedimentos mediante el procedimiento de lixiviación asistida por microondas combinada con la derivatización/SPME y determinación de los analitos extraídos por cromatografía de gases con plasma inducido por microondas–espectrometría de emisión atómica (GC–MIP–AES).

#### IV.2.2.5. APLICACIÓN A MATERIALES DE REFERENCIA Y MUESTRAS REALES

La exactitud del método optimizado para la determinación de compuestos de mercurio en muestras de **material biológico** se estudió mediante el análisis de los materiales de referencia TORT–1, DOLT–2, DORM–2 y CRM 463, que tiene diferentes contenidos de metilmercurio y mercurio total certificados. El método también fue aplicado a una muestra real de un berberecho contaminado (tabla IV.2.13, tabla IV.2.14).

Tabla IV.2.13. Resultado del análisis de metilmercurio en diversos materiales biológicos de origen marino.

Material	Valor Certificado ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Valor Medido (n=6) ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Recuperación (%) (n=6)
TORT–1	$0,128 \pm 0,014$	$0,129 \pm 0,007$	$101 \pm 6$
DOLT–2	$0,693 \pm 0,053$	$0,718 \pm 0,077$	$104 \pm 11$
DORM–2	$4,47 \pm 0,32$	$4,49 \pm 0,29$	$100 \pm 6$
CRM 463	$3,04 \pm 0,16$	$3,14 \pm 0,28$	$103 \pm 9$
Berberecho	–	$0,964 \pm 0,098$	–

Expresado como Media  $\pm$  límites de confianza del 95%, expresada en  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  como Hg, excepto para CRM 463, expresada en  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  como MeHg.

Tabla IV.2.14. Resultado del análisis de mercurio total en diversos materiales biológicos de origen marino.

Material	Valor Certificado ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ como Hg)	Valor Medido <sup>(a)</sup> (n=6) ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ como Hg)	Recuperación (%) (n=6)
TORT-1	$0,33 \pm 0,06$	$0,36 \pm 0,06$	$109 \pm 15$
DOLT-2	$2,14 \pm 0,28$	$2,49 \pm 0,28$	$116 \pm 15$
DORM-2	$4,64 \pm 0,26$	$4,86 \pm 0,50$	$105 \pm 11$
CRM 463	$2,85 \pm 0,16$	$3,17 \pm 0,41$	$111 \pm 14$
Berberecho	-	$1,30 \pm 0,17$	-

Expresado como Media  $\pm$  límites de confianza del 95%; (a) Calculado como la suma del metilmercurio y el mercurio inorgánico obtenido.

En la figura IV.2.14 se muestra un cromatograma obtenido para una muestra del material de referencia TORT-1 para la determinación de metilmercurio y mercurio inorgánico con adición de patrón interno.

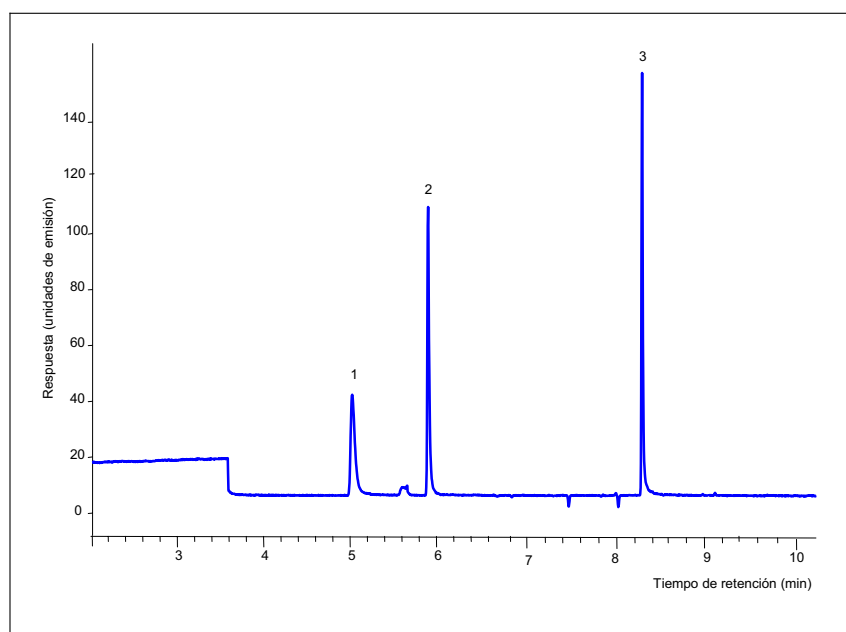


Figura IV.2.14. Cromatograma de GC-MIP-AES (línea de emisión de Hg a 254 nm) para la determinación de los compuestos de mercurio como especies feniladas en una muestra de TORT-1 con patrón interno; 1, MeHg<sup>+</sup>; 2, EtHg<sup>+</sup>; 3, Hg<sup>2+</sup>.

Las medidas obtenidas utilizando calibración con patrón interno (tabla IV.2.13 y IV.2.14) para metilmercurio y mercurio total están en concordancia con los valores certificados. Mostrando que el método es adecuado para la extracción de los compuestos de mercurio en muestras biológicas.

También se estudió la exactitud del método optimizado para la determinación de compuestos de mercurio en **sedimentos** mediante el análisis de los materiales de referencia CRM 580, PACS-2 y IAEA-356, que tiene diferentes contenidos de metilmercurio y mercurio total. El metilmercurio y mercurio inorgánico no se pueden cuantificar simultáneamente, debido a las diferencias de concentraciones en los materiales de referencia, como puede verse en la figura IV.2.15.

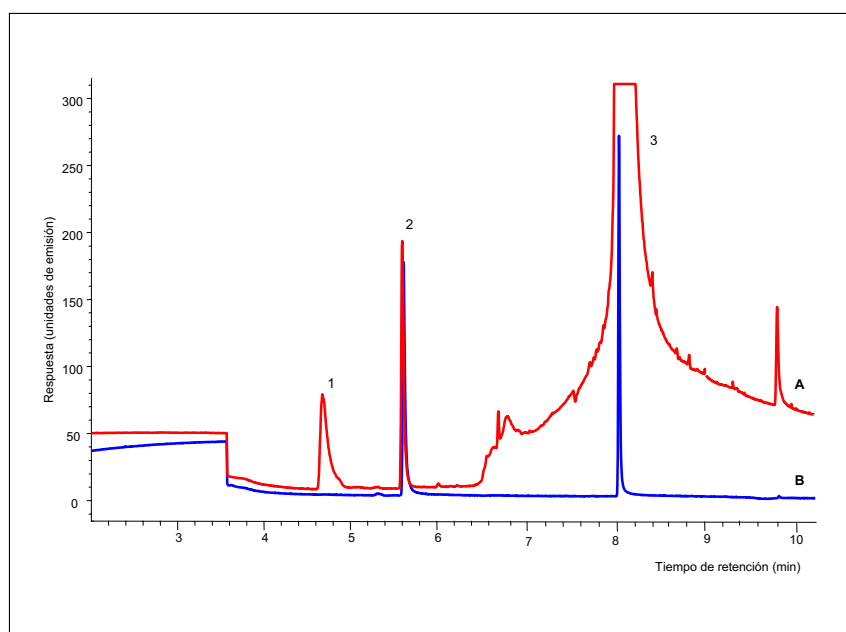


Figura IV.2.15. Cromatograma de GC-MIP-AES (línea de emisión de Hg a 254 nm) para la determinación de los compuestos de mercurio como especies feniladas en una muestra de material de referencia CRM 580; A, determinación de metilmercurio; B, determinación de mercurio inorgánico; 1, MeHg<sup>+</sup>; 2, EtHg<sup>+</sup>; 3, Hg<sup>2+</sup>.



En las tablas IV.2.15 y IV.2.16 pueden verse los resultados para los diferentes materiales de referencia.

Tabla IV.2.15. Resultado del análisis de metilmercurio en materiales de referencia de sedimentos.

Material	Valor Certificado (ng.g <sup>-1</sup> )	Valor Medido (n=6) (ng.g <sup>-1</sup> )	Recuperación (%) (n=6)	Porcentaje de metilación <sup>(a)</sup> (%)
CRM 580	75,5 ± 3,7	141 ± 32	186 ± 42	0,04
PACS-2	-	366 ± 33	-	-
IAEA-356	5,46 ± 0,38	6,59 ± 0,66	120 ± 11	0,02

Expresado como Media ± límites de confianza del 95%, expresada en µg.g<sup>-1</sup> como Hg, excepto para CRM 580, expresada en µg.g<sup>-1</sup> como MeHg; (a) porcentaje estimado de metilación respecto al mercurio inorgánico; (valor medido MeHg (como Hg) - valor certificado MeHg (como Hg))/(valor certificado de Hg total - valor certificado como MeHg).

Tabla IV.2.16. Resultado del análisis mercurio total en materiales de referencia de sedimentos.

Material	Valor Certificado (µg.g <sup>-1</sup> como Hg)	Valor Medido <sup>(a)</sup> (n=6) (µg.g <sup>-1</sup> como Hg)	Recuperación (%) (n=6)
CRM 580	132 ± 3	124 ± 21	94 ± 16
PACS-2	3,04 ± 0,20	2,72 ± 0,66	83 ± 22
IAEA-356	7,62 ± 0,61	7,07 ± 1,46	93 ± 27

Expresado como Media ± límites de confianza del 95%; (a), calculados como la suma del metilmercurio y el mercurio inorgánico obtenido.

Las medidas obtenidas utilizando calibración con patrón interno están en concordancia con los valores certificados de mercurio total (tabla IV.2.16). Sin embargo, se obtienen resultados de metilmercurio mayores que los valores certificados (tabla IV.2.15). Esto puede ser debido a una metilación del mercurio inorgánico<sup>12,13</sup> que, incluso, aunque ocurra en una pequeña proporción (0,02–0,04%), produce sobreestimaciones en la determinación del metilmercurio de entre 20–90% o incluso mayores,

debido a que el metilmercurio representa sólo entre el 0,5–1 % del mercurio total.

Los valores de % de metilación obtenidos en este estudio son comparables con los obtenidos en diversos trabajos publicados<sup>12,13,14,15</sup> en los últimos años utilizando diferentes técnicas de tratamiento de muestra y determinación como se indica en el apartado 1.2.2.5 de la introducción de esta memoria.

Rodríguez Martín-Doimeadios y col.<sup>15</sup> obtienen una metilación del 0,073% para el material de referencia certificado CRM 580 y del 0,111 % para el material de referencia certificado IAEA-356. Ambos materiales han sido usados también en este estudio y se han obtenido unos % de metilación del 0,04 y 0,02%, respectivamente.

Para poder corregir este fenómeno de la metilación sería necesario el uso del método de la dilución isotópica específica de especies<sup>16</sup> (SSID) en combinación con técnicas que permitan la determinación de isótopos (ICP-MS o MS).

Por lo tanto, la determinación de especies de mercurio en sedimentos se alcanzó mediante lixiviación ácida con energía de microondas-derivatización con NaBPh<sub>4</sub>/extracción mediante SPME y determinación por GC-MIP-AES. El método fue validado con materiales de referencia certificados. Pero se produce una sobreestimación del metilmercurio debido, probablemente, a un proceso de metilación abiótica durante el proceso de pretratamiento de muestra.

1. Vázquez, M.J.; Abuín, M.; Carro, A.M.; Lorenzo, R.A.; Cela, R. *Chemosphere* **39** (1999) 1211–1224.
2. Abuín, M.; Carro, A.M.; Lorenzo, R.A. *J. Chromatogr. A* **889** (2000) 185–193.
3. Vazquez, M.J.; Carro, A.M.; Lorenzo, R.A.; Cela, R., *Anal. Chem.* **69** (1997) 221–225.
4. Tseng, C.M.; de Diego, A.; Martin, F.M.; Donard, O.F.X., *J. Anal. At. Spectrom.* **12** (1997) 629–635.
5. Rio Segade, S.; Tyson, J.F., *Spectrochim. Acta, Part B* **58** (2003) 797–807.
6. Cai, Y.; Bayona, J.P., *J Chromatogr. A* **696** (1995) 113–122.
7. Moens, L.; de Smaele T.; Dams, R.; van der Broeck,P.; Sandra, P., *Anal. Chem.* **69** (1997) 1604–1611.
8. Carro, A.M.; Neira, I.; Rodil, R.; Lorenzo, R.A. *Chromatographia* **56** (2002) 733–738.
9. *Nemrod for Windows 95*, LPRAI, Université Aix–Marseille III, Marsella.
10. Arthur, C.L.; Killan, L.M.; Bucholz, K.D.; Pawliszyn, J.; Berg, J.R., *Anal.Chem.* **64** (1992) 1960–1966.
11. Tutschku, S.; Schantz, M.M.; Wise, S.A., *Anal. Chem.* **74** (2002) 4694–4701.
12. Hintelmann, H.; Falter, R.; Ilgen, G.; Evans, R.D. *Fresenius J. Anal. Chem.* **358** (1997) 363–370.
13. Lambertsson, L.; Lundberg, E.; Nilsson, M.; Frech, W., *J. Anal. At. Spectrom.* **16** (2001) 1296–1301.
14. Qvarnström, J.; Frech, W., *J. Anal. At. Spectrom.* **17** (2002) 1486–1491.

15. Rodríguez Martín-Doimeadios, R.C.; Monperrus, M.; Krupp, E.; Amouroux, D.; Donard, O.F.X., *Anal. Chem.* **75** (2003) 3202–3211.
16. Monperrus, M.; Krupp, E.; Amouroux, D.; Donard, O.F.X.; Martín-Doimeadios, R.C., *Trends Anal. Chem.* **23** (2004) 261–272.

### IV.3. DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS ORGANOCORADOS EN AGUA. MONITORIZACIÓN MEDIANTE COMPOSICIÓN ESTRATÉGICA DE MUESTRAS

Es muy importante la determinación de plaguicidas organoclorados en agua mediante procedimientos analíticos que puedan identificarlos y cuantificarlos en el medio ambiente con altos niveles de seguridad, precisión y sensibilidad. La legislación o regulaciones<sup>1,2</sup> concernientes a plaguicidas en muestras de agua de bebida aceptan valores de 0,5  $\mu\text{g.L}^{-1}$  para plaguicidas totales y 0,1  $\mu\text{g.L}^{-1}$  para plaguicidas individuales, exceptuando para heptacloro, aldrin y dieldrin cuyo valor límite es 0,03  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .

Este estudio se centró en la determinación de 8 plaguicidas organoclorados ( $\alpha$ -HCH,  $\gamma$ -HCH, Heptacloro, Aldrin, 4,4'-DDT,  $\alpha$ -Endosulfan, Dieldrin y Endrin) y un compuesto que es un producto de degradación de plaguicidas (endrin cetona) mediante GC-ECD.

Para la extracción de estos compuestos se han comparado dos materiales de extracción en fase sólida (SPE): cartuchos de carbón grafitizado<sup>3,4</sup> (GCB) ENVI-Carb y de copolímeros de divinilbenceno-N-vinilpirrolidona<sup>5,6</sup> (DVB-VP) OASIS HLB, que han demostrado ser adecuados para la extracción de estos compuestos de muestras de agua.

Además, se realizó un estudio de composición de muestras utilizando diseños experimentales supersaturados para el cribado o screening medioambiental de los plaguicidas organoclorados en muestras de agua, demostrando su eficiencia y economía. Se compararon dos matrices: 30

muestras individuales mediante 12 muestras compuestas, y 24 muestras individuales mediante 12 muestras compuestas.

### IV.3.1. MATERIAL Y MÉTODOS

#### IV.3.1.1. PATRONES

Los patrones comerciales utilizados fueron:

$\alpha$ -HCH 99,5 %, 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  en MeOH (Supelco)

$\gamma$ -HCH 99,9 %, 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  en MeOH (Supelco)

Heptacloro 96,4 %, 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  en MeOH (Supelco)

Aldrin 99,0 %, 5000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  en MeOH (Supelco)

4,4'-DDT 98,4 %, 5000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  en MeOH (Supelco)

$\alpha$ -Endosulfan 99,8 % (Riedel de Häen)

Dieldrin 98,0 % (Supelco)

Endrin 98,8 % (Riedel de Häen)

Endrin cetona 98,5 % (Supelco)

A partir de estos patrones comerciales se prepararon disoluciones de los patrones de cada compuesto de una concentración de 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  por pesada en metanol, excepto para el endrin cetona, que se preparó en tolueno-hexano (1:1).

Las disoluciones mezcla de trabajo en el rango de 5-100  $\text{ng.mL}^{-1}$  se prepararon por pesada y dilución de las disoluciones individuales de los 9 compuestos objeto de estudio ( $\alpha$ -HCH,  $\gamma$ -HCH, Heptacloro, Aldrin, 4,4'-DDT,  $\alpha$ -Endosulfan, Dieldrin, Endrin y Endrin cetona) en diclorometano-metanol (9:1) y en acetato de etilo, dependiendo del adsorbente de SPE

empleado en el proceso de preparación de muestra. Todas las disoluciones se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  y protegidas de la luz.

#### **IV.3.1.2. MUESTRAS**

Las muestras utilizadas fueron de agua milli-Q con la correspondiente adición de los compuestos de interés. Estas muestras fueron conservadas a  $-4^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su análisis.

#### **IV.3.1.3. OTRAS DISOLUCIONES**

La disolución de ácido ascórbico  $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  para el acondicionamiento de los cartuchos de carbón grafitizado (GCB) ENVI-Carb se preparó en agua milli-Q, comprobando que el pH de la disolución final era de 2,9.

#### **IV.3.1.4. CONDICIONES INSTRUMENTALES DE MEDIDA**

La separación de los compuestos se realizó utilizando un cromatógrafo de gases HP 5890 Series II Plus con un Detector de captura electrónica. La adquisición y procesado de datos se llevaron a cabo con el software HP 9144 Chemstation.

Los compuestos se separaron en una columna cromatográfica capilar SPB-5 de 30 m de longitud  $\times$  0,32 mm diámetro interno (0,25  $\mu\text{m}$  de espesor de fase). Las condiciones experimentales de medida aparecen resumidas en la tabla IV.3.1.

Tabla IV.3.1. Condiciones experimentales de medida del sistema GC-ECD para la determinación de plaguicidas organoclorados.

<b>Sistema cromatográfico (GC-ECD)</b>	
Temperatura del inyector	250°C
Modo de Inyección	Splitless
Volumen de inyección	3 µL
Tiempo de purga	60 s
Relación de split	1:9
Flujo de gas portador de nitrógeno	3,6 mL/min <sup>-1</sup>
Programa Cromatográfico:	
Temp. Inicial (tiempo inicial)	100 °C (2 min)
Rampa 1	3 °C.min <sup>-1</sup>
Temp. Final 1 (tiempo final 1)	230 °C (0 min)
Rampa 2	10 °C.min <sup>-1</sup>
Temp. Final 2 (tiempo final)	280 °C (10 min)
Temperatura del detector	285 °C
Presión de N <sub>2</sub> de make-up	20 psi

#### **IV.3.1.5. EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS**

La extracción de los plaguicidas organoclorados de las muestras se realizó mediante extracción en fase sólida (SPE) evaluando dos tipos de fases. Por lo tanto, se utilizaron dos procedimientos de extracción de muestras (figura IV.3.1).



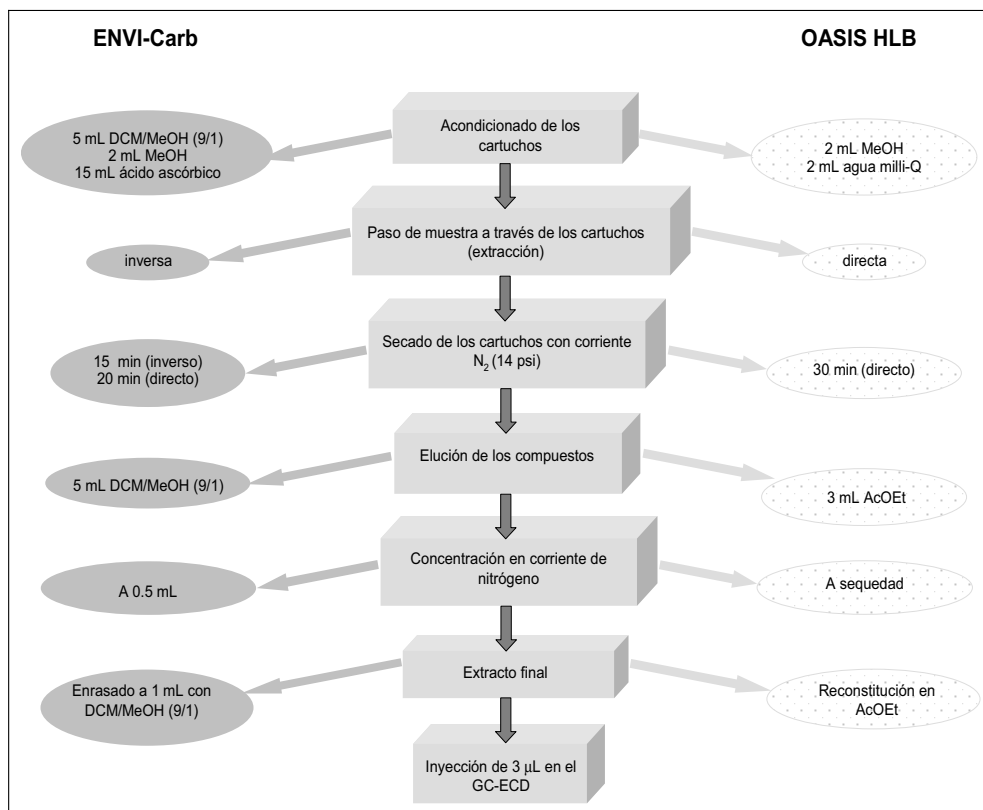


Figura IV.3.1. Esquema de preparación de muestra para la determinación de plaguicidas organoclorados en agua.

#### IV.3.1.5.1. Cartuchos de carbón grafitizado (GCB) ENVI-Carb

En la extracción con cartuchos de carbón grafitizado<sup>4</sup> (GCB) ENVI-Carb, se usa un volumen de muestra de 1500 mL, con la adición de los analitos en metanol. En las extracciones realizadas con los cartuchos ENVI-Carb no es necesario al ajuste del pH de las muestras, la retención de los analitos se produce de manera eficaz al pH del agua milli-Q (aproximadamente 5,5).

El proceso de extracción consta de las siguientes etapas:

- Acondicionamiento: Los cartuchos se acondicionan con 5 mL de diclorometano-metanol (9:1), seguido de 2 mL de metanol y finalmente 15 mL de la disolución de ácido ascórbico 10 g.L<sup>-1</sup>.
- Paso de muestra: La muestra se pasa a través del cartucho en sentido inverso (figura IV.3.2) bajo vacío. Para evitar el desplazamiento de la fase se coloca en el interior del cartucho un pequeño cilindro de teflón.
- Secado: El cartucho se seca con ayuda de una corriente de nitrógeno, 15 minutos en sentido de la extracción y 20 minutos en el sentido contrario (sentido de elución).
- Elución: Los analitos se eluyen con 5 mL de diclorometano-metanol (9:1) en el sentido contrario a la extracción. El extracto se concentra a 0,5 mL, aproximadamente, mediante corriente de nitrógeno, y se diluye hasta 1 mL con la fase eluyente.

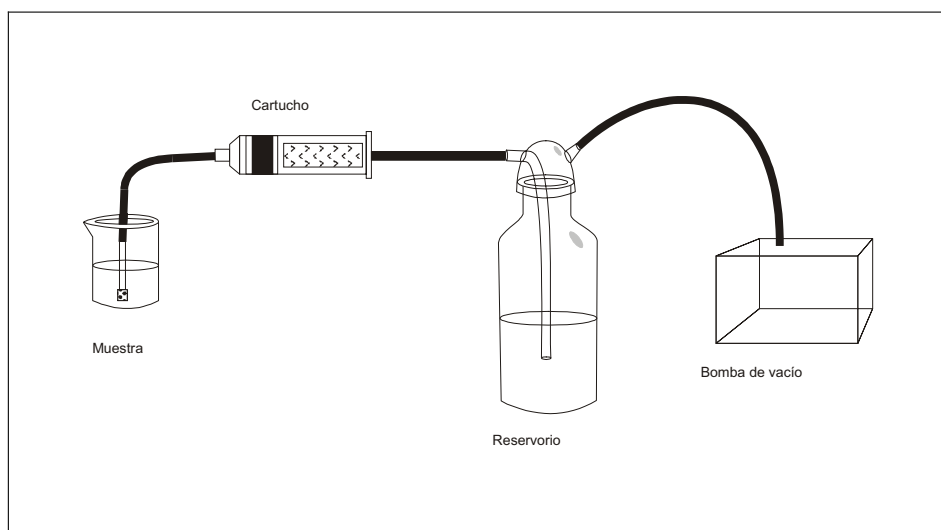


Figura IV.3.2. Esquema del montaje para la extracción con cartuchos de carbón grafitizado (GCB) ENVI-Carb.

#### IV.3.1.5.2. Cartuchos de divinilbenceno–N–vinilpirrolidona (DVB–VP) OASIS

##### HLB

En este caso, para la extracción con cartuchos de divinilbenceno n–vinilpirrolidona<sup>7</sup> (DVB–VP) OASIS HLB se utilizan volúmenes de muestra variables con la adición de los analitos en metanol. Para la extracción de los analitos de manera eficaz con los cartuchos de OASIS HLB es necesario el ajuste del pH a 3,5 con ácido acético antes de la extracción.

Para la validación del método se utilizaron volúmenes de muestra de 200 mL y en el análisis de las muestras compuestas el volumen extraído fue variable, debido a que en la composición estratégica de muestras no se llevaron las muestras a un volumen constante.

El proceso de extracción consta de las siguientes etapas:

- Acondicionamiento: Los cartuchos se acondicionan con 2 mL de metanol y 2 mL de agua milli–Q.
- Paso de muestra: La muestra a pH 3,5 se pasa a través del cartucho bajo vacío (figura IV.3.3).
- Secado: El cartucho se seca con ayuda de una corriente de nitrógeno durante 30 minutos.
- Elución: Los analitos se eluyen con 3 mL de acetato de etilo, se lleva a sequedad y se reconstituye en la fase eluyente a un volumen de 40 µL.

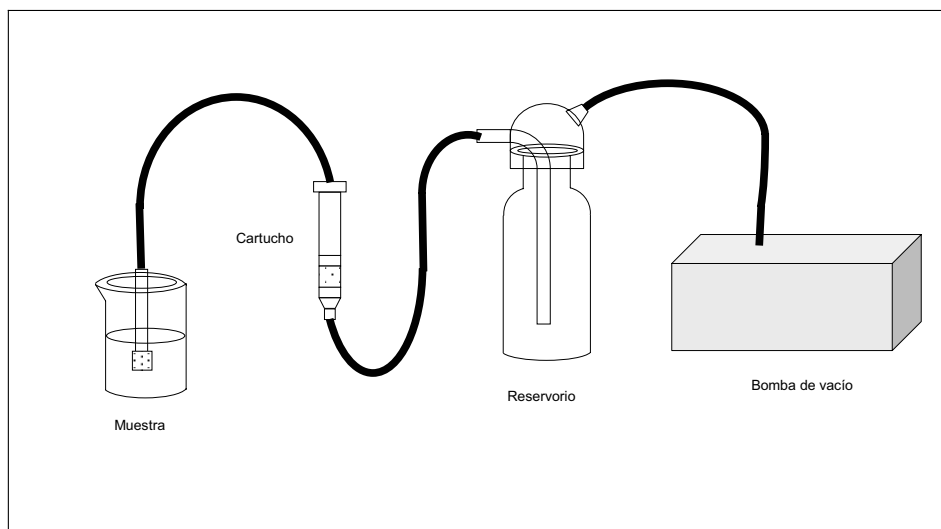


Figura IV.3.3. Esquema del montaje para la extracción con cartuchos de divinilbenceno - N-vinilpirrolidona (DVB-VP) OASIS HLB.

#### IV.3.1.6. MATRIZ DE EXPERIENCIAS. PREPARACIÓN DE MUESTRAS

El cribado de contaminantes en muestras acuosas se realizó mediante composición de muestras utilizando matrices supersaturadas.

Las matrices de experiencias supersaturadas se generaron utilizando el software SUPERGA<sup>8,9</sup>, las matrices seleccionadas fueron una 12x30 (tabla IV.3.2) y una 12x24 (tabla IV.3.3), donde el número de muestras individuales considerado fue 30 y 24, respectivamente, y el número de experiencias (muestras compuestas) fue 12 en los dos casos.

Tabla IV.3.2. Matriz supersaturada 12x30.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
MC1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	
MC2	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	
MC3	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	
MC4	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	
MC5	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	
MC6	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	
MC7	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1
MC8	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0
MC9	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0
MC10	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MC11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MC12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabla IV.3.3. Matriz supersaturada 12x24.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
MC1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0
MC2	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1
MC3	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
MC4	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1
MC5	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1
MC6	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1
MC7	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0
MC8	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0
MC9	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0
MC10	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
MC11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MC12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Por lo tanto, las muestras compuestas se formaron por mezcla de alícuotas de las muestras individuales siguiendo la matriz considerada, usando un código simple 0 o 1, lo que significa que cada muestra compuesta (representadas por las filas) está formada por las muestras

individuales originales (representadas por las columnas) cuando aparece un 1 en esa fila en particular.

Una muestra compuesta, generalmente la de la última fila, está diseñada de modo que incluya todas las muestras individuales originales (toda la fila contiene 1) y se analiza por duplicado y en primer lugar. Si el análisis de esa muestra compuesta es negativo se puede concluir que ninguna muestra individual está contaminada en los límites considerados.

Una vez analizadas las muestras compuestas, los resultados se tratan con el software Gamich<sup>10</sup>, para obtener los valores de concentración de los analitos en las muestras individuales.

Para la aplicación de estas matrices supersaturadas al estudio de composición de muestras para la monitorización de plaguicidas se prepararon dos lotes de muestras.

#### **IV.3.1.6.1. Lote 1: Matriz 12x30**

Para la preparación de las muestras individuales se tomaron 30 botellas con 1 L de agua milli-Q cada una y se numeraron. Algunas, elegidas al azar, fueron contaminadas a diferentes niveles con algunos de los plaguicidas organoclorados estudiados con una concentración máxima de 1000 ng.L<sup>-1</sup>, considerándose tres niveles de contaminación, uno de ellos por debajo del límite máximo aceptado por las normas europeas<sup>1</sup> en aguas.

Cada una de las muestras contaminadas fueron analizadas para poder comparar los resultados obtenidos mediante el análisis directo con los obtenidos mediante la composición de muestras.

A continuación, se prepararon las muestras compuestas siguiendo la matriz 12x30 (tabla IV.3.2), se mezclaron manualmente alícuotas de 50 mL de las muestras individuales correspondientes y, se llevaron a un mismo volumen final de 1,5 L.

Todas estas muestras, tanto las individuales como las compuestas, se sometieron al proceso de SPE con cartuchos ENVI-Carb, siguiendo el procedimiento indicado en el apartado IV.3.1.5.1 y se analizaron mediante GC-ECD.

#### **IV.3.1.6.2. Lote 2: Matriz 12x24**

Se prepararon las muestras individuales en 24 botellas de 0,5 L con agua milli-Q, se numeraron y algunas fueron contaminadas a dos niveles, uno por debajo y otro por encima del límite máximo de la legislación<sup>1</sup>, ambos por debajo de 350 ng.L<sup>-1</sup>.

Estas muestras contaminadas fueron analizadas individualmente para poder comparar los resultados con los obtenidos mediante la composición de muestras.

La construcción de las muestras compuestas se llevó a cabo siguiendo la matriz 12x24 (tabla IV.3.3). El proceso de mezcla se realizó de manera automatizada usando un compositor de muestras automático, tomando alícuotas de 12,5 mL de las muestras individuales. Las muestras compuestas no se llevaron a un volumen final específico, ya que no es necesario tener un volumen constante en las muestras compuestas para la resolución de la matriz supersaturada, evitando así una dilución innecesaria de las muestras.



La extracción de los analitos de todas las muestras se llevó a cabo mediante SPE con cartuchos OASIS HLB según el procedimiento del apartado IV.3.1.5.2 y a continuación se analizaron mediante GC-ECD.

## IV.3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### IV.3.2.1. IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS

Los compuestos se identificaron inyectando los patrones individuales en el sistema GC-ECD. En las condiciones experimentales del sistema GC-ECD descritas en el apartado IV.3.1.4 se obtiene una buena separación de los 9 plaguicidas organoclorados estudiados. En la figura IV.3.4 se presenta un cromatograma de un patrón de los plaguicidas organoclorados de 50 ng.mL<sup>-1</sup> y en la tabla IV.3.4 se muestran los tiempos de retención para cada compuesto.

Tabla IV.3.4. Tiempos de retención de los plaguicidas organoclorados estudiados.

Compuestos	Tiempo de retención/min
$\alpha$ -BHC	18,8
$\gamma$ -BHC	21,0
Heptacloro	25,6
Aldrin	27,8
$\alpha$ -endosulfan	32,6
Dieldrin	34,3
Endrin	35,5
4,4'-DDT	39,5
Endrin cetona	41,4

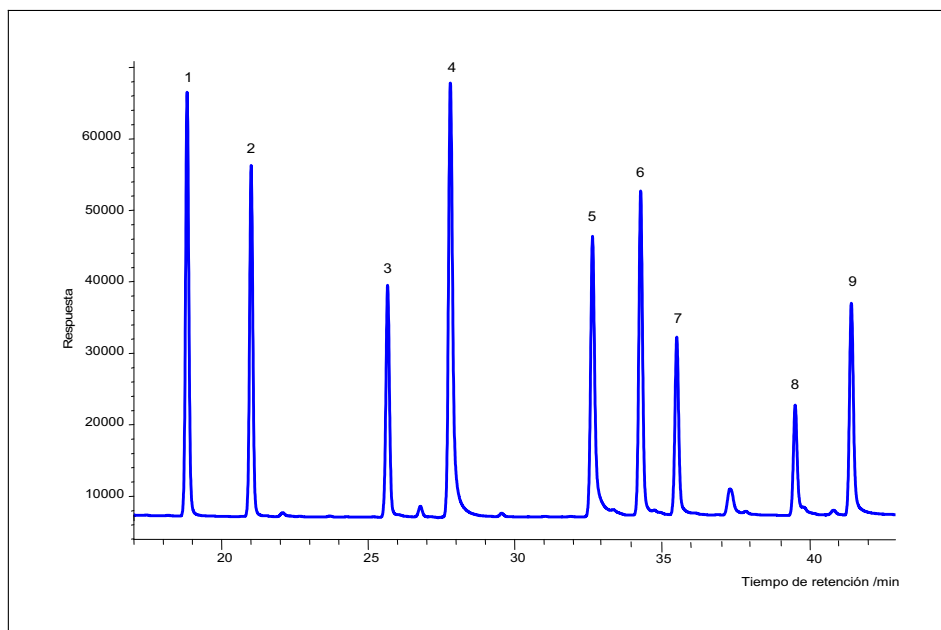


Figura IV.3.4. Cromatograma de GC-ECD para la identificación de los plaguicidas organoclorados (50 ng.mL<sup>-1</sup>); 1,  $\alpha$ -HCH; 2,  $\gamma$ -HCH; 3, heptacloro; 4, aldrin; 5,  $\alpha$ -endosulfan; 6, dieldrin; 7, endrin; 8, 4,4'-DDT; 9, endrin cetona.

#### IV.3.2.2. VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS

En las tablas IV.3.5 y IV.3.6 aparecen recogidos los parámetros analíticos de los métodos de extracción utilizados, tanto para la SPE utilizando cartuchos ENVI-Carb como OASIS HLB, según la descripción del apartado IV.3.1.5.

La calibración se realizó en el rango 5-100 ng.mL<sup>-1</sup>, con 5 niveles inyectados por triplicado, y obteniéndose una buena linealidad en el rango estudiado. Se han obtenido unos coeficientes de correlación mayores de 0,9976 en todos los casos, pasando el test de linealidad y el test de falta de ajuste al 95% de probabilidad cuando se realiza el análisis de varianza.

Los datos de recuperación y precisión para muestras de 10–20 ng.L<sup>-1</sup> fueron aceptables, entre 67–102% y 4,6–9,8% cuando se usaron los cartuchos ENVI–Carb y entre 93–117% y 2,8–16,4% para los cartuchos OASIS HLB.

Los límites de cuantificación, calculados como 10 veces la relación señal/ruido, estuvieron muy por debajo de los límites legales máximos para estos compuestos, y fueron lo suficiente altos como para poder realizar las diluciones impuestas por la composición de muestras, entre 4,7 y 10,1 ng.L<sup>-1</sup> para cartuchos de ENVI–Carb y entre 0,7 y 12,8 ng.L<sup>-1</sup> para OASIS HLB.

Tabla IV.3.5. Parámetros de validación del método de determinación de los plaguicidas organoclorados mediante SPE con cartuchos ENVI–Carb y GC–ECD.

Compuesto	Linealidad / r (a)	Recuperación / % (b)	Repetibilidad / C.V. % (c)	LODs / ng.L <sup>-1</sup> (d)	LOQs / ng.L <sup>-1</sup> (e)
α-BHC	0,9994	88	6,2	2,1	7,0
γ-BHC	0,9994	102	9,4	1,9	6,5
Heptacloro	0,9990	85	8,4	1,7	5,8
Aldrin	0,9996	83	9,5	1,8	6,1
α-endosulfan	0,9997	87	4,6	1,7	5,7
Dieldrin	0,9994	72	8,2	1,4	4,7
Endrin	0,9988	75	6,8	3,1	10,1
4,4'-DDT	0,9985	80	9,8	1,7	5,9
Endrin cetona	0,9976	67	9,4	2,9	9,7

(a) Calibración a 5 niveles (5–100 ng.L<sup>-1</sup>); (b) Recuperación para una muestra de 10–20 ng.L<sup>-1</sup> de cada compuesto (n = 6); (c) muestra de 20 ng.L<sup>-1</sup> (n = 5); (d) definidos para una relación señal/ruido (S/N) de 3; (e) definidos para una relación S/N de 10.

Tabla IV.3.6. Parámetros de validación del método de determinación de los plaguicidas organoclorados mediante SPE con cartuchos OASIS HLB y GC-ECD.

Compuesto	Linealidad / r <sup>(a)</sup>	Recuperación / % <sup>(b)</sup>	Repetibilidad / C.V. % <sup>(c)</sup>	LODs / ng.L <sup>-1</sup> (d)	LOQs / ng.L <sup>-1</sup> (e)
α-BHC	0,9999	95	5,2	0,5	1,5
γ-BHC	0,9999	117	2,8	0,6	2,0
Heptacloro	0,9995	109	4,2	1,0	3,3
Aldrin	0,9999	95	16,4	0,7	2,4
α-endosulfan	0,9999	97	8,4	0,2	0,8
Dieldrin	0,9999	100	4,9	0,2	0,7
Endrin	0,9989	110	10,8	1,0	3,3
4,4'-DDT	0,9982	93	6,5	3,8	12,8
Endrin cetona	0,9979	109	7,3	0,5	1,8

(a) Calibración a 5 niveles (5–100 ng.L<sup>-1</sup>); (b) Recuperación para una muestra de 10–20 ng.L<sup>-1</sup> de cada compuesto (n = 6); (c) muestra de 20 ng.L<sup>-1</sup> (n = 5); (d) definidos para una relación señal/ruido (S/N) de 3; (e) definidos para una relación S/N de 10.

Las dos fases resultan adecuadas para la determinación de los plaguicidas organoclorados en aguas. Los cartuchos OASIS HLB presentan mejores recuperaciones, y la reducción del consumo de muestra y disolvente es considerable.

#### IV.3.2.3. COMPOSICIÓN DE MUESTRAS

Para poder comparar los resultados obtenidos en la composición de muestras, en primer lugar se analizaron las muestras contaminadas individuales. A continuación, se prepararon las muestras compuestas y se analizaron. Por último, los resultados se procesaron usando el software Gamich para obtener las concentraciones estimadas de cada compuesto en cada muestra individual.

### IV.3.2.3.1. Análisis de muestras individuales

Todas las muestras individuales contaminadas fueron analizadas siguiendo los procedimientos del apartado IV.3.1.5, para el lote 1 (matriz 12x30) utilizando el cartucho ENVI-Carb y para el lote 2 (matriz 12x24) el cartucho OASIS HLB.

En las tablas IV.3.7 y IV.3.8 se muestran los resultados obtenidos en el análisis de las muestras individuales del lote 1 y del lote 2, respectivamente.

Tabla IV.3.7. Resultados obtenidos en el análisis de las muestras individuales contaminadas del lote 1.

	$\alpha$ -BHC	$\gamma$ -BHC	Hepta- cloro	Aldrin	$\alpha$ - endosulfan	Dieldrin	Endrin	4,4'- DDT	Endrin cetona
1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2	297,3	nd	nd	nd	19,5	nd	nd	nd	nd
3	nd	nd	14,7	nd	nd	nd	nd	nd	nd
4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
5	nd	309,8	nd	nd	nd	nd	72,5	nd	nd
6	nd	nd	51,7	nd	nd	nd	nd	392,1	nd
7	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
8	nd	nd	nd	277,5	nd	nd	nd	nd	nd
9	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
10	nd	nd	nd	nd	380,8	nd	nd	nd	nd
11	nd	59,1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	396,7
12	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
13	nd	921,9	nd	nd	676,9	nd	nd	nd	nd
14	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
15	nd	nd	103,4	nd	nd	nd	309,0	nd	nd
16	nd	nd	351,4	nd	nd	nd	nd	nd	nd
17	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	904,4
18	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
19	nd	nd	nd	nd	262,4	353,8	nd	nd	nd

**OCPS EN AGUA. COMPOSICIÓN ESTRATÉGICA DE MUESTRAS**

Tabla IV.3.7. Resultados obtenidos en el análisis de las muestras individuales contaminadas del lote 1.

	$\alpha$ -BHC	$\gamma$ -BHC	Hepta- cloro	Aldrin	$\alpha$ - endosulfan	Dieldrin	Endrin	4,4'- DDT	Endrin cetona
20	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
21	805,6	nd	nd	nd	nd	17,2	nd	nd	nd
22	nd	nd	nd	70,5	nd	nd	nd	nd	nd
23	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
24	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	66,5	nd
25	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
26	880,5	nd	nd	14,1	nd	nd	nd	nd	nd
27	nd	nd	nd	nd	nd	939,8	nd	nd	nd
28	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
29	nd	nd	nd	nd	nd	nd	379,7	nd	nd
30	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	320,6	71,5

Todas las concentraciones están expresadas en ng.L<sup>-1</sup>, nd = no detectado.

Tabla IV.3.8. Resultados obtenidos en el análisis de las muestras individuales contaminadas del lote 2.

	$\alpha$ -BHC	$\gamma$ -BHC	Hepta- cloro	Aldrin	$\alpha$ - endosulfan	Dieldrin	Endrin	4,4'- DDT	Endrin cetona
1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2	nd	nd	nd	nd	202,7	nd	nd	nd	54,7
3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
5	306,9	nd	nd	nd	nd	nd	73,1	nd	nd
6	nd	294,0	35,3	nd	nd	nd	nd	nd	nd
7	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
8	nd	nd	146,0	nd	nd	nd	nd	83,4	nd
9	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
10	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
11	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
12	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
13	nd	nd	nd	nd	91,4	313,2	nd	nd	nd
14	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Tabla IV.3.8. Resultados obtenidos en el análisis de las muestras individuales contaminadas del lote 2.

	$\alpha$ -BHC	$\gamma$ -BHC	Hepta- cloro	Aldrin	$\alpha$ - endosulfan	Dieldrin	Endrin	4,4'- DDT	Endrin cetona
15	115,5	nd	nd	nd	nd	nd	nd	192,2	nd
16	nd	98,2	nd	68,4	nd	nd	nd	nd	nd
17	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
18	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
19	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
20	nd	nd	nd	10,8	nd	nd	141,0	nd	nd
21	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
22	nd	nd	nd	nd	nd	210,1	nd	nd	291,9
23	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
24	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Todas las concentraciones están expresadas en ng.L<sup>-1</sup>, nd = no detectado.

#### IV.3.2.3.2. Análisis de las muestras compuestas

Las muestras compuestas se prepararon siguiendo las matrices supersaturadas de las tablas IV.3.2 y IV.3.3, en el primer caso se hizo manualmente y en el segundo de manera automática utilizando un compositor de muestras automático. Este compositor no pudo usarse en el primer caso debido a que la capacidad máxima de los recipientes del compositor eran 300 mL y el volumen final de las muestras era mucho mayor (1,5 L).

La automatización representa una clara ventaja debido a que se evitan posibles errores en la preparación de las muestras compuestas y además libra al analista de un trabajo tedioso. El compositor está controlado por el software Gamich y consiste, como puede verse en la figura IV.3.5, en dos muestreadores giratorios y un dispensador automático con una jeringa de 10 mL. Permite la manipulación de 19 muestras individuales y 19 muestras

compuestas, en caso de necesitar más muestras individuales el sistema se para cuando acaba con la 19 y alerta al analista para que sustituya las muestras por las nuevas. Una limitación importante es el volumen total de las muestras compuestas, ya que los tubos tienen una capacidad máxima de 300 mL.



Figura IV.3.5. Equipo para la preparación automática de las muestras compuestas.

Una vez realizada la composición estratégica de muestras se analizaron las muestras compuestas, siguiendo los correspondientes métodos analíticos, según el apartado IV.3.1.5 utilizando para el análisis del lote 1 (matriz 12x30) cartuchos ENVI-Carb y para el lote 2 (matriz 12x21) los cartuchos OASIS HLB. Los resultados aparecen recogidos en las tablas IV.3.9 y IV.3.10.



Tabla IV.3.9. Resultados obtenidos en el análisis de las muestras compuestas de la matriz 12x30.

	$\alpha$ -BHC	$\gamma$ -BHC	Hepta- cloro	Aldrin	$\alpha$ - endosulfan	Dieldrin	Endrin	4,4'- DDT	Endrin cetona
MC1	42,4	8,8	nd	15,7	12,5	nd	30,0	38,4	34,5
MC2	23,8	24,3	5,4	nd	34,3	28,1	40,6	nd	31,0
MC3	27,4	11,3	3,2	8,2	18,6	12,9	31,5	66,1	15,4
MC4	37,6	28,8	15,0	15,9	22,1	27,5	28,1	38,7	7,9
MC5	121,9	39,2	15,4	8,9	26,8	31,6	nd	4,2	11,3
MC6	41,9	4,0	6,1	8,5	9,1	12,6	14,1	57,4	46,5
MC7	32,9	151,3	3,1	13,5	31,3	42,8	3,8	68,4	5,3
MC8	9,2	3,9	19,9	nd	11,4	47,2	50,1	22,3	17,7
MC9	49,1	nd	20,4	16,2	12,5	nd	12,4	23,8	31,4
MC10	51,4	11,0	19,7	7,8	10,9	13,3	15,6	nd	29,7
MC11	9,3	60,2	3,4	13,7	44,9	nd	4,4	22,8	12,0
MC12	143,6	66,1	21,8	22,7	60,7	49,6	58,6	75,5	59,7

Todas las concentraciones están expresadas en ng.L<sup>-1</sup>, nd = no detectado.

Tabla IV.3.10. Resultados obtenidos en el análisis de las muestras compuestas de la matriz 12x24.

	$\alpha$ -BHC	$\gamma$ -BHC	Hepta- cloro	Aldrin	$\alpha$ - endosulfan	Dieldrin	Endrin	4,4'- DDT	Endrin cetona
MC1	nd	28,7	10,2	6,2	nd	5,6	13,7	13,9	18,3
MC2	18,8	8,9	nd	4,8	4,9	14,5	12,8	nd	18,6
MC3	nd	nd	nd	nd	14,8	nd	nd	nd	6,4
MC4	34,9	nd	nd	nd	15,6	12,9	8,6	21,9	25,3
MC5	13,2	30,6	16,9	4,2	5,9	34,6	13,5	23,8	19,9
MC6	14,7	35,8	15,4	5,3	nd	nd	nd	25,3	nd
MC7	37,6	10,9	nd	4,5	5,7	26,7	8,6	20,5	nd
MC8	nd	nd	18,2	4,0	6,5	32,4	13,0	16,6	nd
MC9	30,4	32,1	11,4	4,4	17,0	11,0	21,9	nd	33,1
MC10	12,7	10,6	nd	4,2	21,0	32,3	nd	18,0	6,1
MC11	33,9	33,7	23,4	nd	19,2	nd	9,7	18,9	8,2
MC12	17,8	15,4	4,7	2,5	10,7	15,5	9,9	11,6	13,8

Todas las concentraciones están expresadas en ng.L<sup>-1</sup>, nd = no detectado.

**OCPS EN AGUA. COMPOSICIÓN ESTRATÉGICA DE MUESTRAS**

Posteriormente, los resultados obtenidos mediante el análisis de las muestras compuestas se procesaron con el software Gamich para resolver la matriz de experiencias y obtener la concentración estimada de cada uno de los 9 pesticidas en cada muestra individual que forma los lotes. Los resultados se muestran en las tablas IV.3.11 y IV.3.12.

Tabla IV.3.11. Resultados de concentración de las muestras individuales obtenidos en el tratamiento de las muestras compuestas de la matriz 12x30 mediante Gamich.

	$\alpha$ -BHC	$\gamma$ -BHC	Hepta-cloro	Aldrin	$\alpha$ -endosulfan	Dieldrin	Endrin	4,4'-DDT	Endrin cetona
1	nd	nd	nd	10,0	5,2	nd	nd	nd	nd
2	315,9	nd	nd	nd	43,8	nd	nd	nd	nd
3	nd	14,1	17,1	22,7	0,2	nd	nd	nd	nd
4	nd	nd	8,9	nd	70,9	nd	51,7	nd	nd
5	nd	384,9	nd	58,6	95,7	nd	nd	nd	nd
6	nd	nd	47,1	nd	nd	nd	nd	453,5	nd
7	nd	nd	nd	nd	101,5	nd	59,6	nd	nd
8	nd	nd	nd	241,1	50,1	nd	nd	nd	nd
9	113,1	nd	10,1	nd	49,3	nd	nd	nd	nd
10	nd	nd	nd	nd	108,8	nd	nd	nd	38,2
11	nd	138,4	13,2	nd	61,4	nd	nd	72,6	106,6
12	nd	50,0	nd	nd	3,3	nd	nd	nd	163,3
13	135,3	1001,5	3,7	nd	487,4	nd	nd	nd	nd
14	nd	nd	nd	nd	nd	nd	28,8	nd	nd
15	nd	nd	126,6	nd	nd	nd	248,1	nd	4,0
16	413,6	nd	399,1	nd	nd	nd	nd	nd	nd
17	nd	nd	nd	nd	nd	nd	15,7	nd	749,9
18	nd	nd	24,1	64,3	nd	nd	nd	nd	nd
19	nd	nd	3,8	nd	nd	340,2	56,9	nd	23,4
20	nd	nd	nd	nd	2,2	nd	28,6	nd	nd
21	740,4	nd	5,9	nd	82,2	9,6	nd	nd	nd
22	298,2	nd	nd	49,8	nd	nd	nd	nd	8,4
23	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	23,9	nd
24	245,2	nd	nd	18,0	nd	nd	nd	132,0	33,4

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Tabla IV.3.11. Resultados de concentración de las muestras individuales obtenidos en el tratamiento de las muestras compuestas de la matriz 12x30 mediante Gamich.

	$\alpha$ -BHC	$\gamma$ -BHC	Hepta- cloro	Aldrin	$\alpha$ - endosulfan	Dieldrin	Endrin	4,4'- DDT	Endrin cetona
25	108,4	nd	nd	nd	50,0	nd	nd	nd	nd
26	917,9	nd	nd	98,9	3,7	nd	nd	nd	nd
27	nd	nd	4,0	nd	7,2	837,1	nd	nd	nd
28	nd	nd	nd	nd	67,8	7,3	nd	nd	156,8
29	nd	nd	nd	nd	35,0	nd	831,9	nd	nd
30	nd	nd	nd	18,0	6,0	nd	nd	1207,3	84,6

Todas las concentraciones están expresadas en ng.L<sup>-1</sup>, nd = no detectado.

Tabla IV.3.12. Resultados de concentración de las muestras individuales obtenidos en el tratamiento de las muestras compuestas de la matriz 12x24 mediante Gamich.

	$\alpha$ -BHC	$\gamma$ -BHC	Hepta- cloro	Aldrin	$\alpha$ - endosulfan	Dieldrin	Endrin	4,4'- DDT	Endrin cetona
1	44,9	46,5	nd	nd	9,8	nd	nd	nd	nd
2	nd	nd	nd	nd	171,0	nd	nd	nd	81,6
3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	23,2	nd
4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
5	260,1	nd	nd	nd	nd	nd	58,2	nd	nd
6	nd	274,3	43,5	nd	nd	nd	nd	nd	nd
7	nd	nd	nd	nd	nd	nd	32,6	62,6	nd
8	nd	nd	129,9	nd	nd	nd	nd	86,8	nd
9	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
10	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
11	nd	nd	nd	3,6	nd	nd	nd	nd	nd
12	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
13	nd	nd	nd	3,3	64,8	298,3	nd	nd	nd
14	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
15	119,1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	155,6	nd
16	nd	76,1	nd	37,1	nd	nd	nd	nd	nd
17	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
18	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
19	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Tabla IV.3.12. Resultados de concentración de las muestras individuales obtenidos en el tratamiento de las muestras compuestas de la matriz 12x24 mediante Gamich.

	$\alpha$ -BHC	$\gamma$ -BHC	Hepta- cloro	Aldrin	$\alpha$ - endosulfan	Dieldrin	Endrin	4,4'- DDT	Endrin cetona
20	nd	nd	nd	30,6	nd	nd	120,9	nd	nd
21	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
22	nd	nd	nd	nd	nd	59,1	14,4	nd	229,0
23	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
24	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Todas las concentraciones están expresadas en ng.L<sup>-1</sup>, nd = no detectado.

#### IV.3.2.3.3. Comparación de los resultados

Tras el análisis de todas las muestras y el correspondiente tratamiento de los datos, se compararon gráficamente, para una interpretación más sencilla, los resultados del análisis de las muestras individuales (tablas IV.3.7 y IV.3.8) con los valores predichos por el Gamich tras la composición de muestras (tablas IV.3.11 y IV.3.12) y con los valores esperados por la adición realizada, como se muestra en las figuras IV.3.6 y IV.3.7.

Como puede observarse en las figuras IV.3.6, en general, las muestras individuales contaminadas son detectadas por la técnica de composición de muestras utilizando la matriz 12x30 (tabla IV.3.2) y las estimaciones de los valores de concentración son buenas, especialmente para  $\gamma$ -HCH, heptacloro, dieldrin y 4,4'-DDT.

En algunos casos aparecen falsos positivos y falsos negativos. Para  $\alpha$ -HCH, aldrin, endrin cetona las estimaciones producen falsos positivos, en el caso de  $\alpha$ -endosulfan y endrin aparecen falsos negativos. Se consideran falsos positivos cuando para una muestra individual no contaminada la

composición de muestras da un valor de concentración, y falsos negativos cuando las muestras individuales contienen los analitos y la predicción de la composición de muestras es “no detectado”.

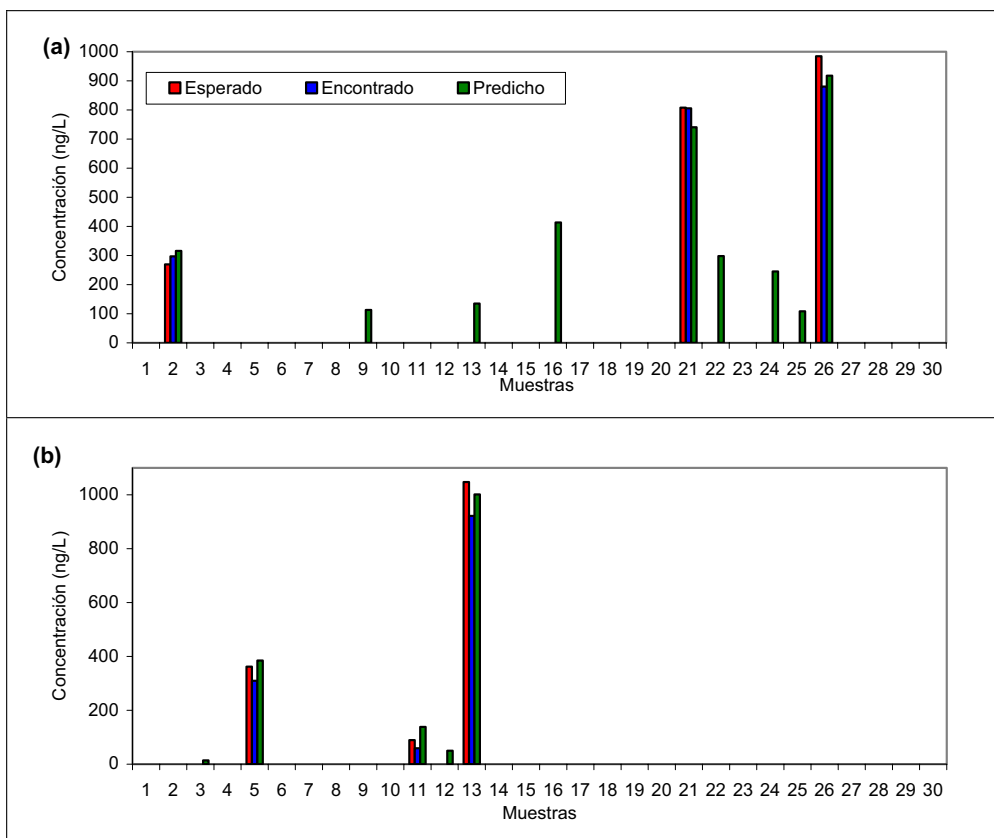


Figura IV.3.6. Resultados comparativos en el lote 1 para (a)  $\alpha$ -HCH; (b)  $\gamma$ -HCH. Esperado = concentración esperada en función de la cantidad adicionada; Encontrado = concentración medida individualmente en cada muestra; Predicho = resultados de concentración predichos por la composición estratégica de muestras usando la matriz 12x30 (tabla IV.3.2).

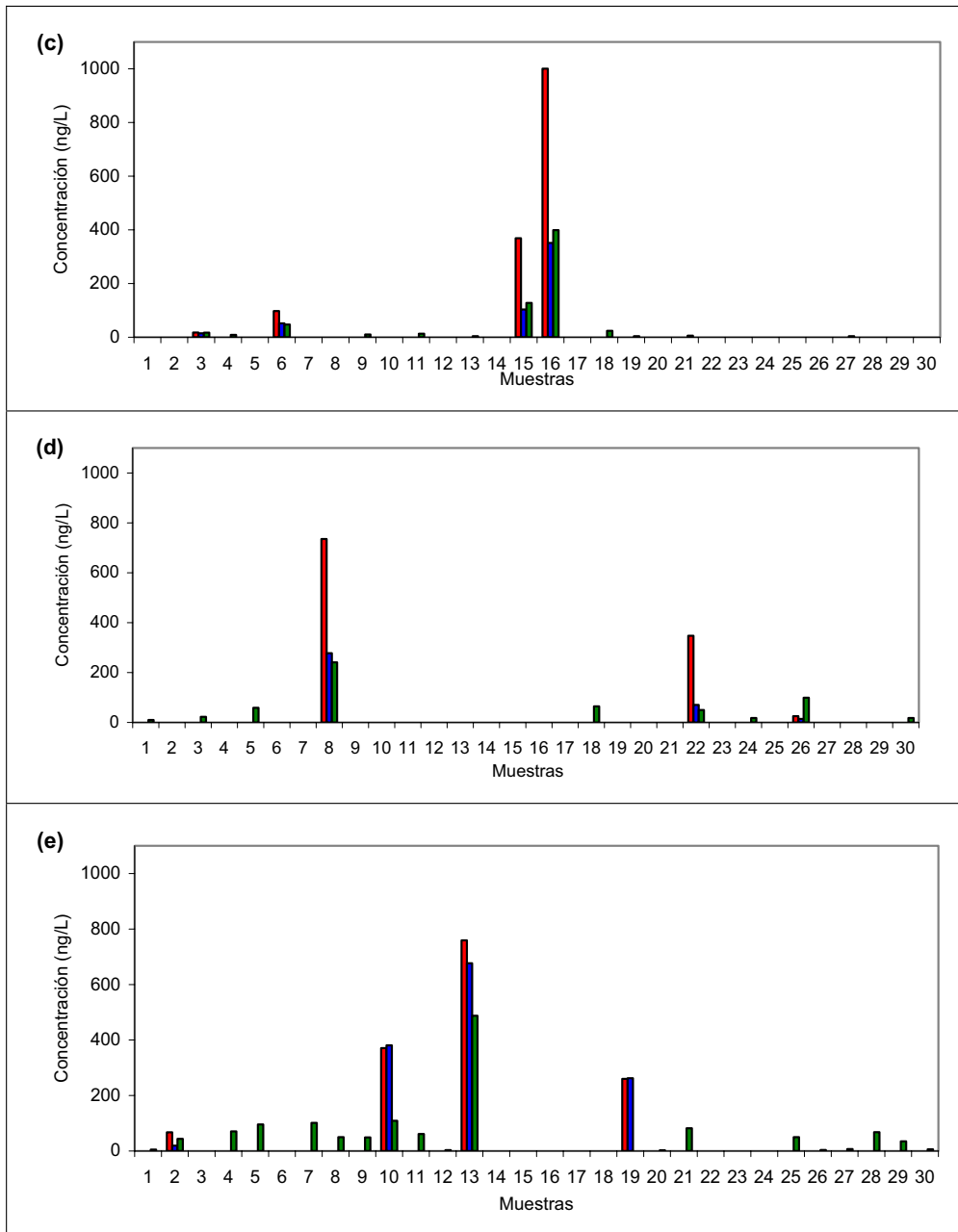


Figura IV.3.6. Resultados comparativos en el lote 1 para (c) Heptachloro; (d) Aldrin; (e) 4,4'-DDT. Esperado = concentración esperada en las muestras en función de la cantidad adicionada de cada plaguicida; Encontrado = concentración medida individualmente en cada muestra; Predicho = resultados de concentración predichos por la composición estratégica de muestras usando la matriz 12x30 (tabla IV.4.2).

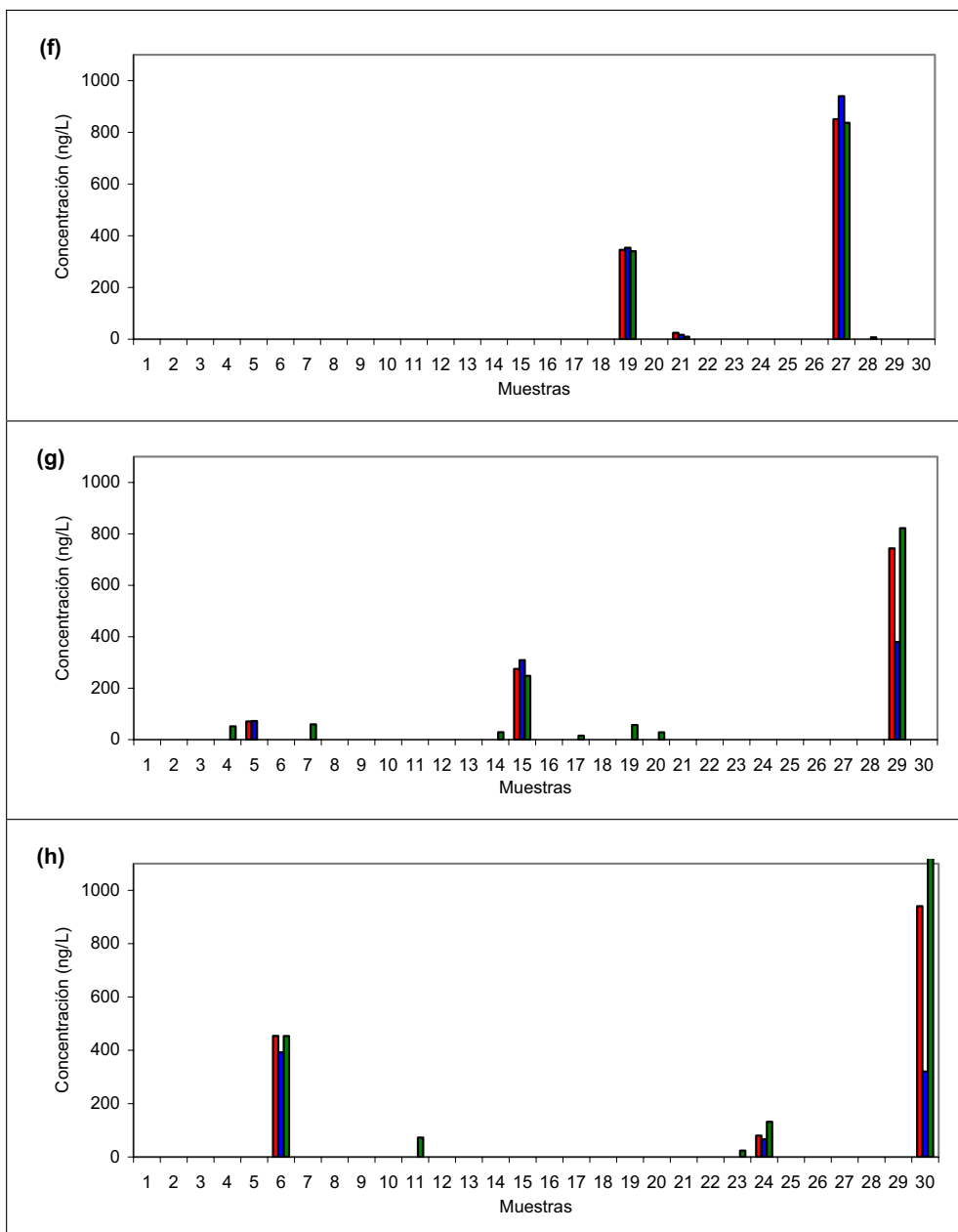


Figura IV.3.6. Resultados comparativos en el lote 1 para (f)  $\alpha$ -Endosulfan; (g) Dieldrin; (h) Endrin. Esperado = concentración esperada en función de la cantidad adicionada; Encontrado = concentración medida individualmente; Predicho = resultados de concentración predichos por la composición estratégica de muestras usando la matriz 12x30 (tabla IV.3.2)

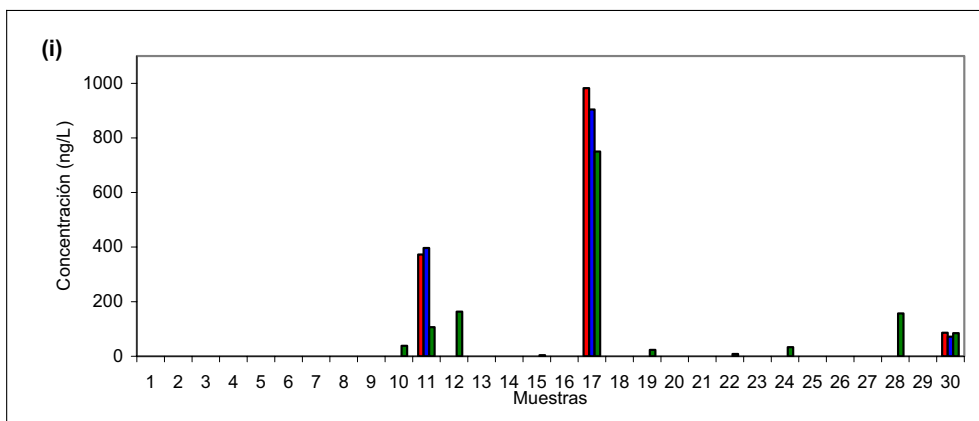


Figura IV.3.6. Resultados comparativos en el lote 1 para (i) Endrin cetona. Esperado = concentración esperada en las muestras en función de la cantidad adicionada de cada plaguicida; Encontrado = concentración medida individualmente en cada muestra; Predicho = resultados de concentración predichos por la composición estratégica de muestras usando la matriz 12x30 (tabla IV.3.2).

Mediante la composición estratégica de muestras utilizando la matriz 12x24 (tabla IV.3.3) las muestras individuales contaminadas son detectadas correctamente y las estimaciones de los valores de concentración son buenas como puede verse en las figuras IV.3.7, especialmente para heptacloro,  $\alpha$ -endosulfan, dieldrin y endrin cetona. En algunos casos aparecen falsos positivos, como en el caso de  $\alpha$ -HCH,  $\gamma$ -HCH, aldrin, endrin 4,4'-DDT.



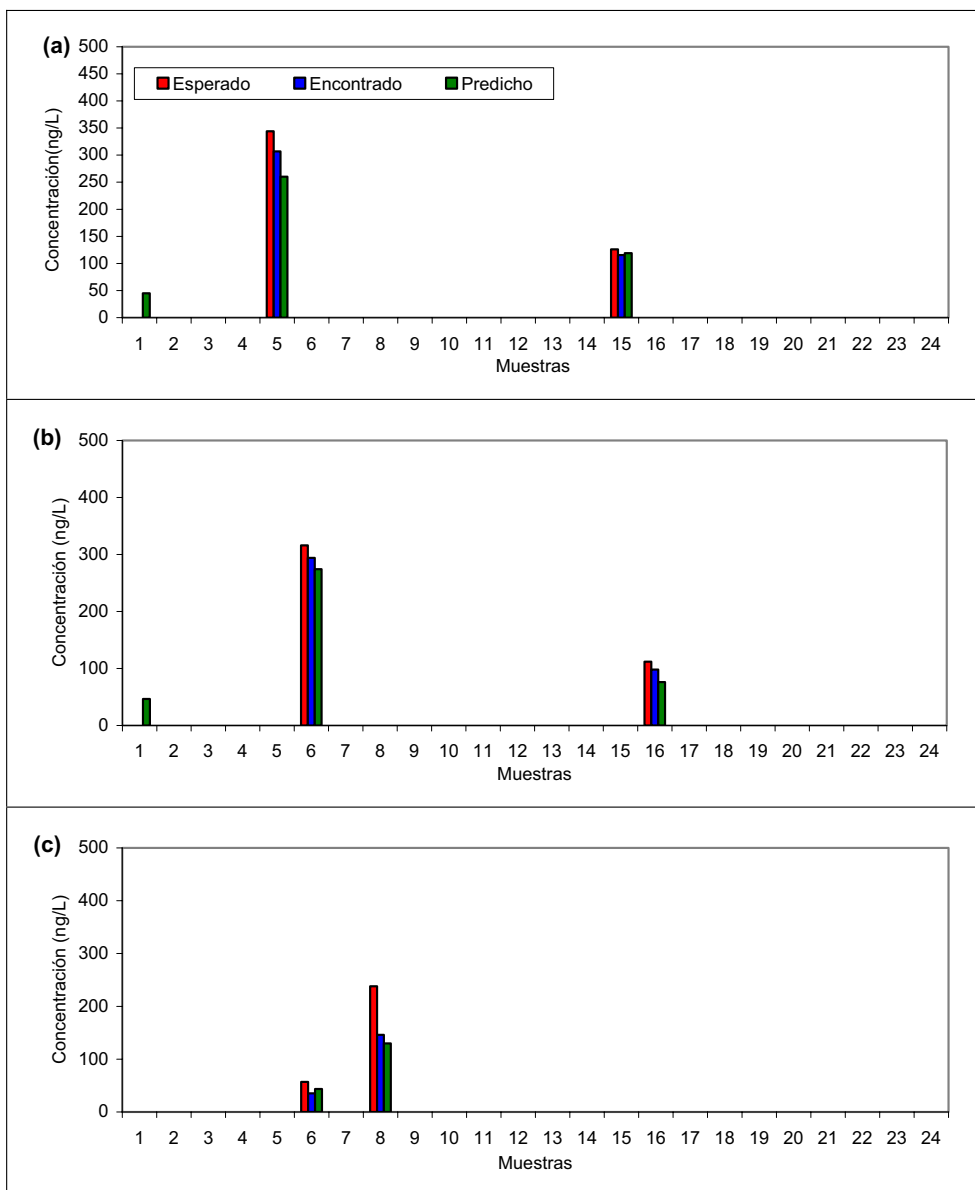


Figura IV.3.7. Resultados comparativos en el lote 2 para (a)  $\alpha$ -HCH; (b)  $\gamma$ -HCH; (c) Heptachloro. Esperado = concentración esperada en las muestras en función de la cantidad adicionada de cada plaguicida; Encontrado = concentración medida individualmente en cada muestra; Predicho = resultados de concentración predichos por la composición estratégica de muestras usando la matriz 12x24 (tabla IV.3.3).

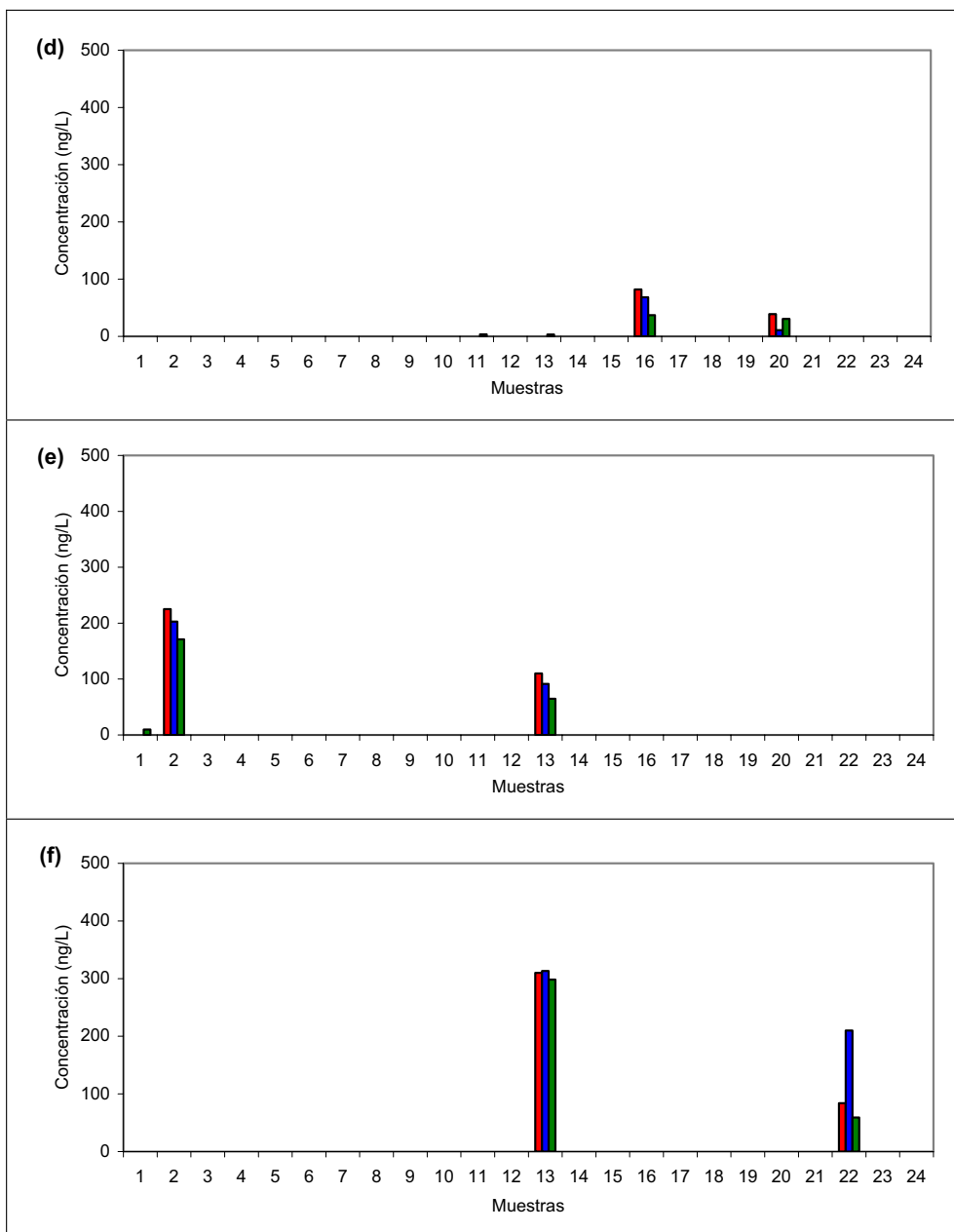


Figura IV.3.7. Resultados comparativos en el lote 2 para (d) Aldrin; (e) 4,4'-DDT; (f)  $\alpha$ -Endosulfan. Esperado = concentración esperada en las muestras en función de la cantidad adicionada de cada plaguicida; Encontrado = concentración medida individualmente en cada muestra; Predicho = resultados de concentración predichos por la composición estratégica de muestras usando la matriz 12x24 (tabla IV.3.3).

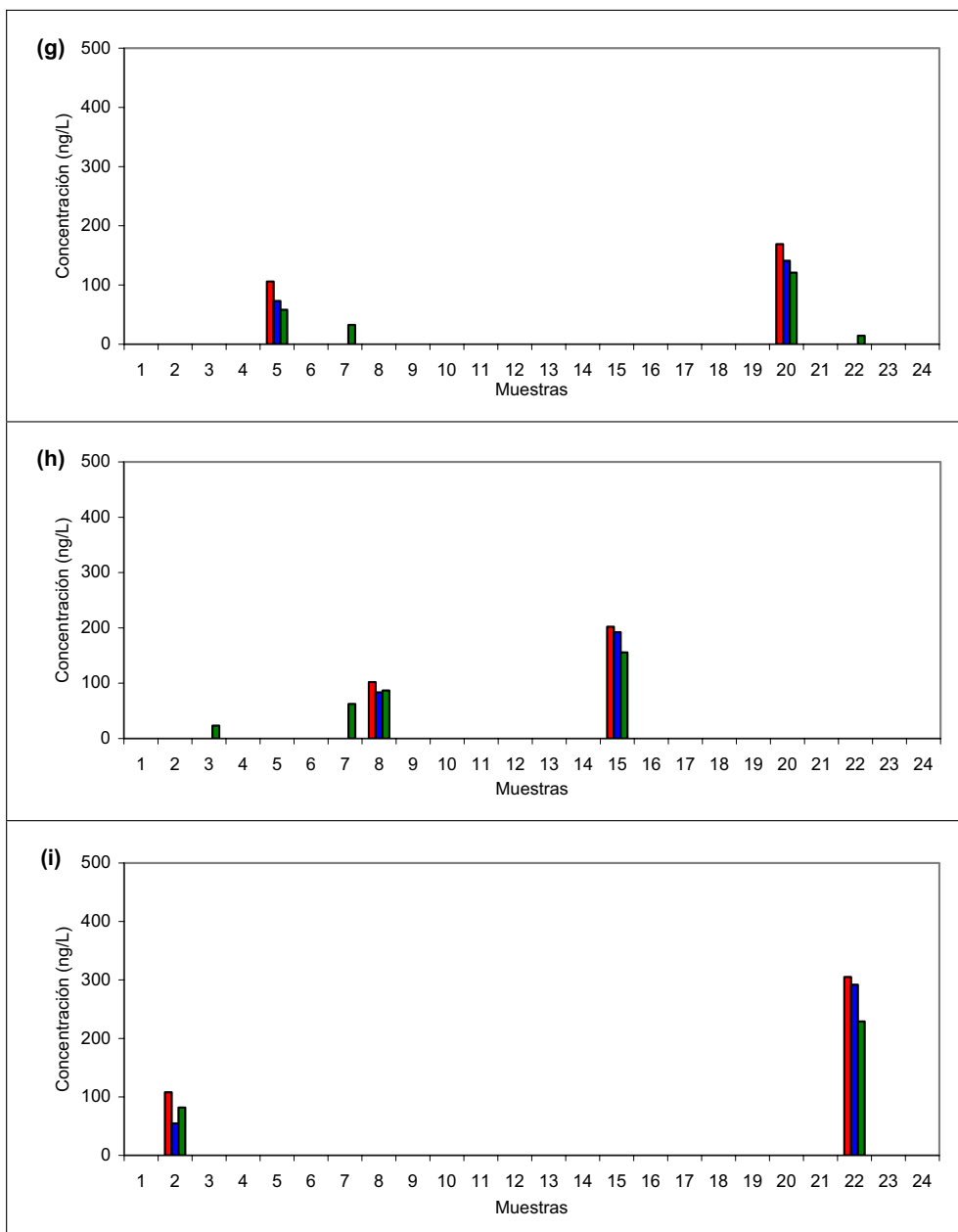


Figura IV.3.7. Resultados comparativos en el lote 2 para (g) Dieldrin; (h) Endrin; (i) Endrin cetona. Esperado = concentración esperada en las muestras en función de la cantidad adicionada de cada plaguicida; Encontrado = concentración medida individualmente en cada muestra; Predicho = resultados de concentración predichos por la composición estratégica de muestras usando la matriz 12x24 (tabla IV.3.3).

Es necesario establecer un criterio para considerar la importancia de los falsos positivos y falsos negativos encontrados. Este criterio puede ser en función del límite de cuantificación o de detección o incluso respecto a los límites de la legislación europea<sup>1</sup>, es decir 100 ng.L<sup>-1</sup> para cada plaguicida.

Por lo tanto, valores obtenidos por debajo del límite de cuantificación o detección se pueden considerar como muestras no contaminadas.

Normalmente lo que resulta interesante es conocer la contaminación de las muestras respecto al límite legal (MRL). En este caso, las muestras con valores mucho más grandes que este límite se consideran que están contaminadas y claramente por debajo de este límite se consideran no contaminadas. Las muestras contaminadas entre estas dos bandas se consideran sospechosas de estar contaminadas, por lo tanto aquellas muestras cuyo valor esté en la cercanía del límite legal deben ser reanalizadas individualmente para confirmar su posible contaminación.

Usando estos criterios se calcularon las proporciones de falsos positivos y falsos negativos, así como la proporción de éxito en la predicción para los dos lotes de muestras, para poder comparar los resultados.

A la vista de los datos de la tabla IV.3.13, los resultados del Lote 2 son mejores que los del 1. Esto en parte es debido a la mayor dilución a la que se ven sometidas las muestras del lote 1, como consecuencia de la matriz 12x30, y que el método presenta mayores límites de cuantificación (tabla IV.3.5). En la mayoría de los casos los datos de concentración en las

muestras compuestas se encuentran entre el límite de detección y de cuantificación, por lo que el error experimental en el lote 1 puede comprometer seriamente los resultados de la composición estratégica de muestras para cada una de las muestras individuales, principalmente en aquellas con una concentración cercana al límite legal máximo. Esto se aprecia en un pequeño porcentaje de falsos positivos y falsos negativos.

En el caso del lote 2, la dilución no compromete los resultados en las muestras compuestas, ya que los valores de concentración en las muestras compuestas están por encima del límite de cuantificación. Por lo tanto, se pueden ver claramente las ventajas de la composición estratégica de muestras frente al análisis de las muestras individuales, pues se obtiene una buena estimación de los niveles de concentración en las muestras mientras reduce a la mitad el número de análisis.

Tabla IV.3.13. Evaluación de la eficiencia de las predicciones mediante la composición estratégica de muestras para las muestras del lote 1 y 2, teniendo en cuenta diferentes criterios.

<b>Lote 1</b>	<b>LODs</b>	<b>LOQs</b>	<b>MRLs</b>
Éxito (%)	79,3	83,0	95,6
Falsos Positivos (%)	20,0	16,3	4,1
Falsos Negativos (%)	0,7	0,7	0,3
<b>Lote 2</b>	<b>LODs</b>	<b>LOQs</b>	<b>MRLs</b>
Éxito (%)	95,8	95,8	99,1
Falsos Positivos (%)	4,2	4,2	0,0
Falsos Negativos (%)	0,0	0,0	0,9

Por lo tanto, la composición de muestras estratégica es una herramienta que reduce el número de análisis que tienen que realizarse, reduciendo por lo tanto el coste y el tiempo requerido.

Además, el uso de equipos automatizados para la preparación de las muestras compuestas, tal como se observa con los resultados obtenidos con el lote 2, evita errores humanos y procedimientos de trabajo tediosos.

Dependiendo del método de extracción y de sus límites de detección y cuantificación se pueden construir matrices de diferentes tamaños, obteniendo resultados robustos con matrices con una relación filas–columnas 1:2, siendo no recomendable superar una relación 1:3. Esto es debido a que al aumentar la relación filas–columnas se produce un mayor número de factores (muestras individuales) correlacionados, por lo que el software Gamich encontrará más dificultades para alcanzar un óptimo global.

- 
1. Directiva 80/778/CEE del Consejo, de 15 de julio de 1980, relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano, Diario Oficial de las Comunidades Europeas n° L 229, 30/08/1980, p. 0011 – 0029.
  2. Clean Water Act, codification 33 U.S.C. 1251–et seq., P.L. 95–217, Dec.28, 1977, Water Quality Act P.L. 100–4, Feb 4, 1987, amendments 1997.
  3. Di Corcia, A.; Samperi, R.; Marcomini, R.; Stelluto, S., *Anal. Chem.* **65** (1993) 907–912.
  4. Carro, A.M.; Cobas, J.C.; Rodríguez, J.B.; Lorenzo, R.A.; Cela, R., *J. Anal. At. Spectrom.* **14** (1999) 1867–1873.
  5. Piedra, L.; Tejedor, A.; Hernando, M.D.; Aguera, A.; Barceló, D.; Fernández–Alba, A., *Chromatographia* **52** (2000) 631–638.
  6. Lacassie, E.; Marquet, D.; Gaulier, J.M.; Dreyfuss, M.F.; Lachâtre, G., *Forensic Sci. Int.* **121** (2001) 116–125.

7. Jiménez, J.J.; Bernal, J.L.; del Nozal, M.J.; Toribio, L.; Arias, E., *J. Chromatogr. A* **919** (2001) 147–156.
8. Cela, R.; Martínez, E.; Carro, A.M., *Chemom. Intell. Lab. Sys.* **52** (2000) 167–182.
9. Martínez, E., Composición de muestras mediante Diseño experimental. Aplicaciones en Química Analítica Ambiental. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela (2001).
10. Cela, R.; Martínez, E.; Carro, A.M., *Chemom. Intell. Lab. Sys.* **57** (2001) 72–92.





#### IV.4. DETERMINACIÓN DE PIORRETARDANTES ORGANOFOSFORADOS Y PLASTIFICANTES Y DE SUS POSIBLES PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN EN AGUAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA–ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM

En este trabajo se pone a punto un método para la determinación de pirorretardantes organofosforados y plastificantes en aguas mediante extracción en fase sólida (SPE) y cromatografía líquida–espectrometría de masas en tandem (LC–MS/MS). Se determinaron 11 compuestos organofosforados, 4 triarilfosfatos, 3 tricloroarilfosfatos, 1 triarilfosfato, 2 bisfosfatos y un intermediario sintético, el óxido de trifenilfosfina. La cromatografía líquida elimina algunos problemas presentes en la cromatografía de gases<sup>1,2,3,4</sup> para la determinación de estos compuestos, como son las colas en los picos (TPPO) y las dificultades de análisis de nuevos pirorretardantes fosforados poco volátiles (RDP y BDP).

También, se ha intentado la identificación y determinación de sus productos de hidrólisis, posibles metabolitos de degradación, principalmente los mono–/dialquil–/arilfosfatos en muestras de agua; algunos de estos compuestos se producen industrialmente como DnBP<sup>5</sup>, MEHP y DEHP<sup>6</sup>. Para ello, se ha utilizado LC–MS/MS mediante formación de par iónico con tributilamonio (TrBA), evitando así el paso necesario de derivatización para su análisis mediante cromatografía de gases<sup>7</sup>.

El análisis de estos compuestos en muestras de agua es importante para poder controlar sus concentraciones en el medio, ya que el agua

puede ser un medio de distribución de estos compuestos en el medio ambiente. Y, principalmente en las estaciones de depuración de aguas residuales, es donde se puede actuar para evitar su difusión por el medio acuático. Por lo tanto, los métodos se aplicaron a muestras de agua residual para el estudio de su comportamiento en el medio acuático.

#### **IV.4.1. MATERIAL Y MÉTODOS**

##### **IV.4.1.1. PATRONES**

Los patrones comerciales usados fueron los siguientes:

Tri (2-cloroetil)fosfato (TCEP), 97 % (Aldrich)

Oxido de trifenilfosfina (TPPO), 98 % (Aldrich)

Tri (1-cloro-2-propil)fosfato (TCPP), mezcla 3 isómeros (Akzo Nobel)

Tri n-propilfosfato (TPrP), 99 % (Aldrich)

Tri (1,3-dicloro-2-propil)fosfato (TDCP), 98,5 % (Fluka)

Trifenilfosfato (TPhP), 99 % (Aldrich)

Tri i-butilfosfato (TiBP), 97 % (Fluka)

Tri n-butilfosfato (TnBP), 99 % (Aldrich)

Tri (2-butoxietil)fosfato (TBEP), 94 % (Aldrich)

Resorcinol bi (difenilfosfato) (RDP), mezcla técnica (Akzo Nobel)

Bisfenol A bi (difenilfosfato) (BDP), mezcla técnica (Azko Nobel)

Tri (2-etilhexil)fosfato (TEHP), 97 % (Aldrich)

Difenilfosfato (DPhP), 99 % (Aldrich)

Monofenilfosfato (MPhP), 95 % (Aldrich)

Di n-butilfosfato (DnBP), 97 % (Fluka)

Di(2-etilhexil)fosfato (DEHP), 97 % (Aldrich)

Dibenzilfosfato (DBzP), 99 % (Aldrich)

A partir de estos patrones comerciales se prepararon disoluciones patrón individuales de cada compuesto por pesada de  $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , en acetonitrilo para los trialquil-/arilfosfatos y bisfosfatos, y en metanol para los mono-/dialquil-/arilfosfatos, y se guardaron a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

A partir de las disoluciones stock se prepararon patrones mezcla de trabajo de  $5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  por pesada y dilución en metanol-agua ultrapura (ELGA) (1:1) para los trialquil-/arilfosfatos, y en agua ultrapura (ELGA) para los mono-/dialquil-/arilfosfatos. Los patrones de trabajo de RDP y BDP se prepararon por separado, debido a que estos productos técnicos contienen impurezas de otros fosfatos como TPhP. Los patrones de TPrP y DBzP se prepararon de manera individual, ya que se usaron como patrón interno en la determinación de los trialquil-/arilfosfatos y mono-/dialquil-/arilfosfatos, respectivamente.

#### **IV.4.1.2. HIDRÓLISIS QUÍMICA DE LOS TRIÉSTERES DEL ÁCIDO FOSFÓRICO**

Para estudiar los posibles productos de hidrólisis de los triésteres del ácido fosfórico usados como pirorretardantes, se realizó la hidrólisis básica de los compuestos, obteniendo los mono- y di-ésteres para fines cualitativos.

Para la realización de la hidrólisis, se mezclaron  $2 \text{ mmol}$  del compuesto precursor con  $4 \text{ mmol}$  de NaOH ( $2 \text{ mL}$  de una disolución  $2\text{M}$  preparada en agua-metanol (2:8)), en un tubo de  $5 \text{ mL}$ . El tubo se cerró, y se dejó reaccionar durante  $2 \text{ h}$  a  $100^\circ\text{C}$ . Pasado este tiempo, la disolución se enfrió, se neutralizó con HCl en exceso ( $4,5 \text{ mmol}$ ) y se diluyó con agua-

metanol (1:1). Las disoluciones obtenidas se usaron para la identificación de los productos de hidrólisis y el desarrollo del método LC-ESI-MS/MS.

#### **IV.4.1.3. MUESTRAS**

Para la optimización y validación de los métodos de extracción se usaron muestras de agua ultrapura, a las que se le añadió los compuestos de interés.

Las muestras de agua residual utilizadas se obtuvieron de una planta de tratamiento de agua residual de Berlín. Se utilizaron muestras del agua residual sin tratar (influyente), el agua residual tras un tratamiento de sedimentación (efluente primario) y el agua residual tras el tratamiento biológico, es decir, al final del tratamiento (efluente terciario).

#### **IV.4.1.4. OTRAS DISOLUCIONES**

La disolución tampón con tributilamina (TrBA) 50 mM fue utilizada para la formación del par iónico en la extracción de los mono-/di-ésteres del ácido fosfórico. Se preparó por mezcla 1:1 de dos disoluciones, la primera de tributilamina 100 mM en agua con un 4% de metanol con el pH ajustado a 5 con ácido fórmico, y la segunda disolución de acetato amónico 100 mM en agua.

#### **IV.4.1.5. CONDICIONES INSTRUMENTALES DE MEDIDA**

En este trabajo se utilizó un cromatógrafo de líquidos modelo HP 1100 consistente en una unidad desgasificadora, una bomba binaria de alta presión, un muestreador automático y un termostato para la columna cromatográfica, acoplado a un espectrómetro de masas en tándem modelo

Quattro LA triple-stage, equipado con una interfase de electrospray (ESI) modelo Z-spray (Micromass). La adquisición y procesado de los datos se realizó con el software Masslynx 3.3.

#### IV.4.1.5.1. Separación y detección de los piroretardantes fosforados

La separación de los trialquil-/arilfosfatos se realizó en una columna Luna C18 Phenomenex de 150x3 mm, con un tamaño de partícula de 3  $\mu\text{m}$ , en las condiciones experimentales que pueden verse en la tabla IV.4.1.

Tabla IV.4.1. Condiciones experimentales de la separación mediante LC para la determinación de los piroretardantes organofosforados.

Cromatógrafo de Líquidos (LC)		
Volumen de inyección	50 $\mu\text{L}$	
Flujo	0,25 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$	
Temperatura de la columna	45 $^{\circ}\text{C}$	
Eluyente A	MeOH-H <sub>2</sub> O (20:80), 0,2% Ácido fórmico	
Eluyente B	MeOH, 0,2% Ácido fórmico	
Gradiente	0 min	55% B
	0,5 min	70% B
	11 min	100% B
	16 min	100% B
	17 min	55% B
	27 min	55% B

La detección se realizó mediante ionización con electrospray espectrometría de masas en tándem (ESI-MS/MS) en modo positivo. Los parámetros comunes mediante *multiple reaction monitoring* (MRM) aparecen reflejados en la tabla IV.4.2 y los parámetros de medida óptimos para cada uno de los compuestos aparecen en la tabla IV.4.3.

Tabla IV.4.2. Parámetros comunes óptimos del sistema ESI-MS/MS para la determinación de piroretardantes organofosforados.

Parámetro	Valor
Modo de ionización	positivo
Voltaje del capilar	3,5 kV
Temperatura de la fuente	120 °C
Temperatura de desolvatación	200 °C
Flujo del gas de nebulización	100 L.h <sup>-1</sup>
Flujo del gas de secado	700 L.h <sup>-1</sup>
Presión del gas de colisión (Ar)	1,0. 10 <sup>-3</sup> mbar

Tabla IV.4.3. Parámetros individuales óptimos del sistema ESI-MS/MS para la determinación de piroretardantes organofosforados.

Comp.	Formula empírica	tr / min	Transiciones MRM <sup>(a)</sup>	Ion Producto Propuesto	Tr. 1 / Tr.2 <sup>(b)</sup>
TCEP	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub> Cl <sub>3</sub> P	6,3	285(25) > 63(14)	[C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> Cl] <sup>+</sup>	1,4
			285(25) > 161(22)	[(M+H) - 2x(C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> Cl)] <sup>+</sup>	
TPPO	C <sub>18</sub> H <sub>15</sub> OP	8,7	279(50) > 201(28)	[(M+H) - Benzene] <sup>+</sup>	2,5
			279(50) > 77(44)	[C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ] <sup>+</sup>	
TCPP	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub> Cl <sub>3</sub> P	9,6	327(25) > 99(20)	[H <sub>4</sub> PO <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	1,0
			329(25) > 99(20)	[H <sub>4</sub> PO <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	
TPrP	C <sub>9</sub> H <sub>21</sub> O <sub>4</sub> P	9,7	225(20) > 99(16)	[H <sub>4</sub> PO <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	-
TDCP	C <sub>9</sub> H <sub>15</sub> O <sub>4</sub> Cl <sub>6</sub> P	11,5	431(25) > 99(25)	[H <sub>4</sub> PO <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	1,2
			433(25) > 99(25)	[H <sub>4</sub> PO <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	
TPhP	C <sub>18</sub> H <sub>15</sub> O <sub>4</sub> P	11,7	327(35) > 215(26)	[C <sub>12</sub> H <sub>9</sub> ] <sup>+</sup>	1,7
			327(35) > 153(30)	[(PhO) <sub>2</sub> PO - H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	
TiBP	C <sub>12</sub> H <sub>27</sub> O <sub>4</sub> P	12,8	267 (35) > 99(22)	[H <sub>4</sub> PO <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	2,0
			267(35) > 155(10)	[(M+H) - 2xC <sub>4</sub> H <sub>8</sub> ] <sup>+</sup>	

Tabla IV.4.3. Parámetros individuales óptimos del sistema ESI-MS/MS para la determinación de piroretardantes organofosforados.

Comp.	Formula empírica	tr / min	Transiciones MRM <sup>(a)</sup>	Ion Producto Propuesto	Tr. 1 / Tr.2 <sup>(b)</sup>
TnBP	C <sub>12</sub> H <sub>27</sub> O <sub>4</sub> P	13,0	267 (35) > 99(22)	[H <sub>4</sub> PO <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	2,0
			267(35) > 155(10)	[(M+H) - 2xC <sub>4</sub> H <sub>8</sub> ] <sup>+</sup>	
TBEP	C <sub>18</sub> H <sub>39</sub> O <sub>7</sub> P	13,6	399(30) > 199(12)	[(M+H) - 2xC <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O] <sup>+</sup>	1,0
			399(30) > 299(12)	[(M+H) - C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O] <sup>+</sup>	
RDP	C <sub>30</sub> H <sub>24</sub> O <sub>8</sub> P <sub>2</sub>	15,2	575(50) > 575.1(25)	[M+H] <sup>+</sup>	17
			575(50) > 419(35)	[(M+H) - PO <sub>3</sub> Ph] <sup>+</sup>	
BDP	C <sub>39</sub> H <sub>34</sub> O <sub>8</sub> P <sub>2</sub>	17,5	693(45) > 367(36)	[(M+H) - OP(OPh) <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	13
			693(45) > 327(32)	[HOP(OPh) <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	
TEHP	C <sub>24</sub> H <sub>51</sub> O <sub>4</sub> P	21,4	435.4(45) > 99(14)	[H <sub>4</sub> PO <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	2,7
			435.4(45) > 113(12)	[C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> ] <sup>+</sup>	

(a) Ion precursor (voltaje del cono/V) > Ion producto (energía de colisión/eV); (b) Relación de intensidades entre las dos transiciones.

#### IV.4.1.5.2. Separación y detección de los productos de hidrólisis

La separación de los mono-/dialquil-/arilfosfatos se realizó en una columna Luna Phenyl-Hexyl Phenomenex de 150x 2 mm, con un tamaño de partícula de 3 μm, en las condiciones experimentales que pueden verse en la tabla IV.4.4.

Tabla IV.4.4. Condiciones experimentales de la separación mediante LC para la determinación diéster- y monoéster del ácido fosfórico.

Cromatógrafo de Líquidos (LC)		
Volumen de inyección	50 µl	
Flujo	0,20 mL.min <sup>-1</sup>	
Temperatura de la columna	45 °C	
Eluyente A	MeOH-H <sub>2</sub> O (20:80), 1 mM TrBA, 1 mM HAc	
Eluyente B	MeOH- H <sub>2</sub> O (95:5), 1 mM TrBA, 1 mM HAc	
Gradiente	0 min	25% B
	0,5 min	40% B
	15 min	48% B
	16 min	100% B
	18 min	100% B
	19 min	25% B
	28 min	25% B

La detección se realizó mediante ionización con electrospray espectrometría de masas en tándem (ESI-MS/MS) en modo negativo. Los parámetros comunes mediante *multiple reaction monitoring* (MRM) aparecen reflejados en la tabla IV.4.5, y los parámetros de medida óptimos para cada uno de los compuestos aparecen en la tabla IV.4.6.

Tabla IV.4.5. Parámetros comunes óptimos del sistema ESI-MS/MS para la determinación de los mono- y diésteres del ácido fosfórico.

Parámetro	Valor
Modo de ionización	negativo
Voltaje del capilar	3,0 kV
Temperatura de la fuente	120 °C
Temperatura de desolvatación	200 °C
Flujo del gas de nebulización	100 L.h <sup>-1</sup>
Flujo del gas de secado	700 L.h <sup>-1</sup>
Presión del gas de colisión (Ar)	1,0. 10 <sup>-3</sup> mbar



Tabla IV.4.6. Parámetros individuales óptimos del sistema ESI-MS/MS para la determinación de mono-/diésteres del ácido fosfórico.

Comp.	Formula empírica	tr / min	Transiciones MRM <sup>(a)</sup>	Ion Producto Propuesto	Tr. 1 / Tr.2 <sup>(b)</sup>
MCP	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> ClO <sub>4</sub> P	4,4	173(40) > 137(8)	[M - H - HCl] <sup>-</sup>	2,8
			175(40) > 137(8)	[M - H - HCl] <sup>-</sup>	
MiBP	C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> O <sub>4</sub> P	4,7	153(50) > 79(14)	[PO <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	
MnBP					
MPhP	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub> P	5,1	173(20) > 79(12)	[PO <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	
MBEP	C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> O <sub>5</sub> P	7,4	197(50) > 79(16)	[PO <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	
DCEP	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub> PCl <sub>2</sub>	7,9	221(25) > 35(8)	[Cl] <sup>-</sup>	2,4
			223(25) > 37(8)	[Cl] <sup>-</sup>	
DCPP	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> O <sub>4</sub> PCl <sub>2</sub>	11,4	249(30) > 35(8)	[Cl] <sup>-</sup>	2,3
			251(30) > 37(8)	[Cl] <sup>-</sup>	
DiBP	C <sub>8</sub> H <sub>19</sub> O <sub>4</sub> P	13,3	209.1(25) > 79(22)	[PO <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	2,3
			209.1(25) > 152(14)	[M - H - C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> ] <sup>-</sup>	
DnBP	C <sub>8</sub> H <sub>19</sub> O <sub>4</sub> P	14,0	209.1(25) - 79(22)	[PO <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	2,3
			209.1(25) - 152(14)	[M - H - C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> ] <sup>-</sup>	
DPhP	C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> O <sub>4</sub> P	14,6	249(35) > 93(26)	[PhO] <sup>-</sup>	9,8
			249(35) > 155(20)	[M - PhOH] <sup>-</sup>	
MEHP	C <sub>8</sub> H <sub>19</sub> O <sub>4</sub> P	15,8	209(50) > 79(14)	[PO <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	
DBzP	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> O <sub>4</sub> P	18,8	277.06(45) > 79(32)	[PO <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	
DBEP	C <sub>12</sub> H <sub>27</sub> O <sub>6</sub> P	20,0	297(50) > 79(24)	[PO <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	5,0
			297(50) > 197(18)	[M-H - C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> ] <sup>-</sup>	
DEHP	C <sub>16</sub> H <sub>37</sub> O <sub>4</sub> P	23,4	321.2(25) > 79(26)	[PO <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	4,6
			321.2(25) > 209(22)	[M - H - C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> ] <sup>-</sup>	

(a) Ion precursor (voltaje del cono/V) > Ion producto (energía de colisión/eV); (b) Relación de intensidades entre las dos transiciones.

#### IV.4.1.6. PREPARACIÓN DE MUESTRAS

En primer lugar, se filtraron las muestras, excepto las de agua ultrapura (ELGA), mediante un equipo de filtración bajo presión de nitrógeno, a través de un filtro de celulosa de 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro.

La extracción de las muestras se realizó mediante extracción en fase sólida (SPE) en un sistema de extracción automatizado, modelo Autotrace SPE Workstation, que permite la extracción simultánea de seis muestras, como se muestra en la figura IV.4.1.

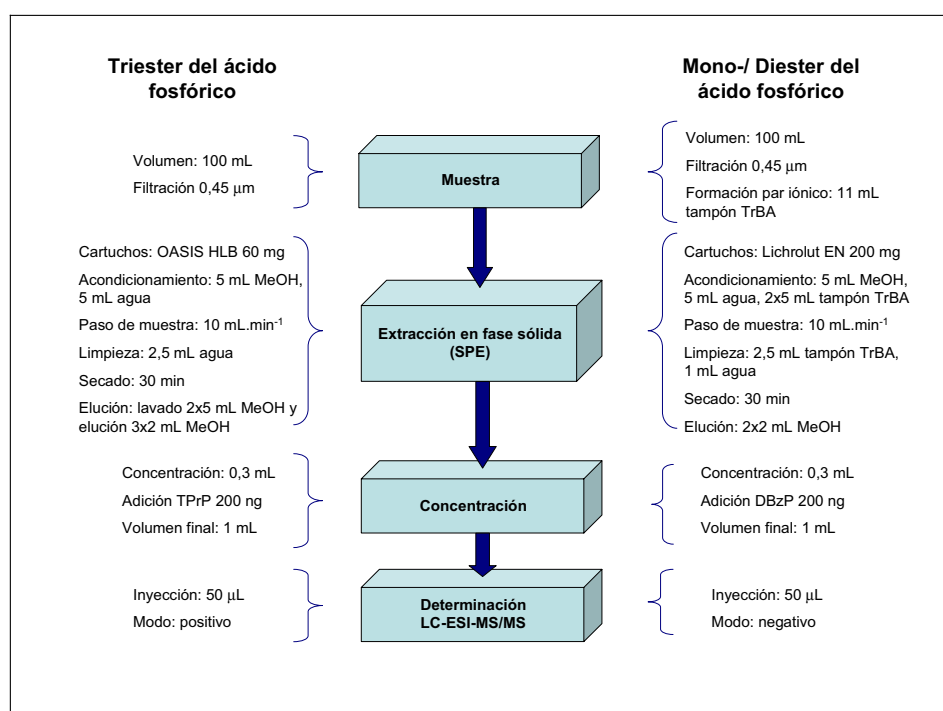


Figura IV.4.1. Esquema de preparación de muestra.

#### **IV.4.1.6.1. Extracción de los pirorretardantes organofosforados**

La extracción se realizó con cartuchos de divilbenceno-*n*-vinilpirrolidona (DVB-VP) OASIS HLB de 60 mg como se indica a continuación:

- Acondicionamiento: Los cartuchos se acondicionan con 5 mL de metanol, seguido de 5 mL de agua ultrapura.
- Paso de muestra: 100 mL de muestra se pasó a través del cartucho a un flujo de 10 mL.min<sup>-1</sup>.
- Limpieza: El cartucho se lavó con 2,5 mL de agua ultrapura.
- Secado: El cartucho se seca con ayuda de una corriente de nitrógeno durante 30 minutos.
- Elución: Lavado del sistema de 2 x 5 mL de metanol y elución de los analitos con 3 x 2 mL de metanol.

Los extractos se concentraron en el Turbo vap II a 0,3 mL, se les añadieron 40 µL de una disolución de patrón interno (TPrP) de 5 µg.mL<sup>-1</sup>, y se diluyeron a un volumen final de 1 mL con agua ultrapura.

Las muestras se cuantificaron mediante el método de adición estándar con patrón interno. Para ello, se tomaron alícuotas de 200 µL del extracto y se les añadieron diferentes cantidades de patrones y se llevaron a un volumen final de 250 µL.

#### **IV.4.1.6.2. Extracción de los productos de hidrólisis**

La extracción se realizó con cartuchos Lichrolut EN (200 mg) mediante formación de par iónico, utilizando un tampón de tributilamina 50 mM, como se indica a continuación:

- Acondicionamiento: Los cartuchos se acondicionan con 5 mL de metanol, seguido de 5 mL de agua ultrapura y 2 veces con 5 mL del tampón.
- Paso de muestra: 100 mL de muestra + 11 mL de tampón se pasó a través del cartucho a un flujo de 10 mL.min<sup>-1</sup>.
- Limpieza: El cartucho se lavó con 2,5 mL de tampón y 1 mL de agua ultrapura.
- Secado: El cartucho se seca con ayuda de una corriente de nitrógeno durante 30 minutos.
- Elución: Los analitos se eluyen con 2 x 2 mL de metanol.

Los extractos se concentraron en el Turbo vap II a 0,3 mL, se les añadieron 40 µL de una disolución de patrón interno (DBzP) de 5 µg.mL<sup>-1</sup>, y se diluyeron a un volumen final de 1 mL con agua ultrapura.

Las muestras se cuantificaron mediante el método de adición estándar con patrón interno, para ello se tomaron alícuotas de 200 µL del extracto y se les añadieron diferentes cantidades de patrones, y se llevaron a un volumen final de 250 µL.

#### **IV.4.1.7. ESTUDIO DE BIODEGRADACIÓN**

Se realizó un estudio de degradación biológica para evaluar la posible formación biológica de ésteres de fosfato mono- y di-sustituidos a partir de los ésteres de fosfato tri-sustituidos, basándose en las normas EN ISO 7827<sup>8</sup>.

Las pruebas se realizaron en botellas de 2,5 L con 2 L de agua ultrapura, 10 mg.L<sup>-1</sup> de lodo, un tampón fosfato<sup>8</sup> y una adición de 50 µg.L<sup>-1</sup> del compuesto investigado. Las botellas se cerraron con papel permitiendo la aireación de la disolución pero impidiendo la entrada de partículas y se mantuvieron en oscuridad y con agitación magnética. A estas botellas se les añadió una vez por semana leche en polvo (50 mg.L<sup>-1</sup>) para suministrar una fuente de carbono a los microorganismos. En otra botella se adicionaron sales de mercurio (II) para impedir el desarrollo bacteriano.

Se tomaron muestras de unos 40 mL de los experimentos, al inicio del mismo, a las 6 y 24 horas, y cada dos o tres días. Estas muestras se filtraron inmediatamente a través de un filtro de 0,45 µm y se congelaron hasta el momento de ser analizadas mediante LC-MS/MS.

#### **IV.4.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

##### **IV.4.2.1. RESULTADOS DE LA HIDRÓLISIS QUÍMICA**

Debido a que sólo 4 mono-/di-sustituidos ésteres de fosfato están disponibles comercialmente, se llevó a cabo la hidrólisis alcalina de los compuestos precursores.

La mayoría de las reacciones de hidrólisis dieron lugar a los ésteres di-sustituídos y en menor proporción a los mono-sustituídos, excepto para los compuestos clorados donde la reacción tuvo lugar en menor proporción o no tuvo lugar. Así, para el TCEP se obtuvo sólo el éster di-sustituído y para el TDCP, la reacción no tuvo lugar.

Las mezclas de los productos obtenidos se utilizaron para la optimización de las condiciones de detección mediante MS/MS y de la separación mediante LC.

#### **IV.4.2.2. OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE DETECCIÓN ESI-MS/MS**

Los principales parámetros a optimizar para la detección de los compuestos estudiados mediante ESI-MS/MS, a parte del modo de ionización, fueron el voltaje del cono y la energía de colisión. Para poder determinarlos se realizó la infusión de los patrones individuales, en primer lugar variando el voltaje del cono en busca de la máxima señal del ión molecular protonado (ESI positivo) o desprotonado (ESI negativo). Una vez fijado el voltaje del cono, se optimizó la energía de colisión, mediante la infusión directa en modo *daughter*, buscando la máxima señal de los diferentes iones producto procedentes de un ion precursor seleccionado. Se seleccionaron las dos transiciones más intensas para la cuantificación del compuesto.

##### **IV.4.2.2.1. Optimización y espectro de MS/MS para los ésteres tri-sustituídos**

Para la optimización de los parámetros de ESI-MS/MS de los trialkil-/arilfosfatos y bisfosfatos se realizó la infusión de los patrones individuales

en modo ESI positivo. En primer lugar, se optimizó el voltaje del cono, buscando la máxima señal del ión molecular protonado  $[M+H]^+$ .

En la figura IV.4.2 se puede ver la variación de la señal del ión  $[M+H]^+$  ( $m/z$  267) con el voltaje del cono para su optimización para el TnBP. Como puede verse la señal aumenta hasta los 35 V, a voltajes del cono mayores comienza su descenso, por lo que se fijó el voltaje del cono en 35 V.

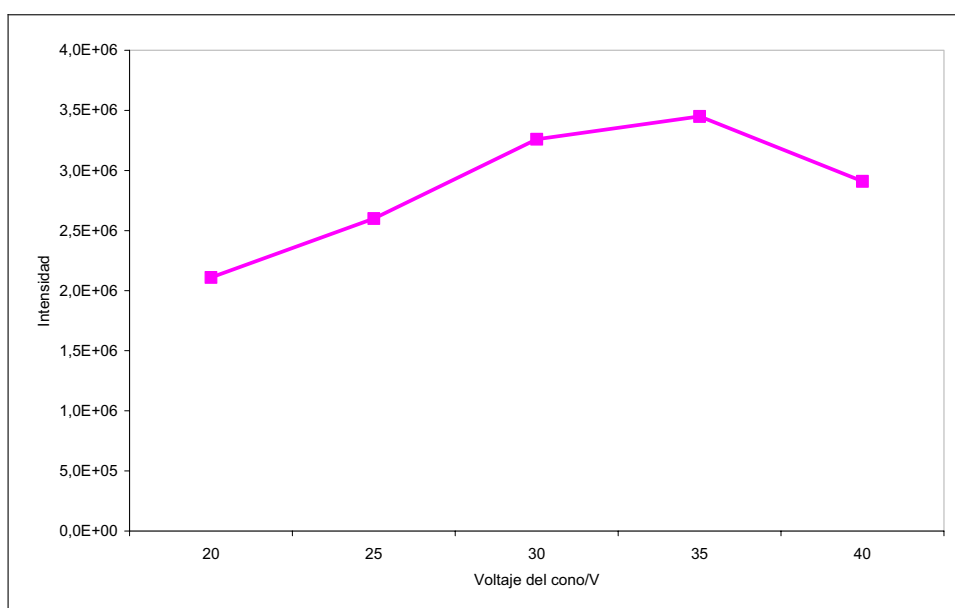


Figura IV.4.2. Optimización del voltaje del cono de ESI del TnBP ( $m/z$  267).

Una vez fijado el voltaje del cono para cada compuesto, se optimizó la energía de colisión. En la figura IV.4.3 se muestra la disminución de la señal del ion precursor protonado ( $m/z$  267) y la variación de la señal de los iones producto, obteniendo los máximos para estos iones,  $m/z$  211 a 10 eV,  $m/z$  155 a 10 eV y  $m/z$  99 a 22 eV. Las dos transiciones seleccionadas son las que alcanzan una mayor intensidad, es decir,  $m/z$  155 y  $m/z$  99.

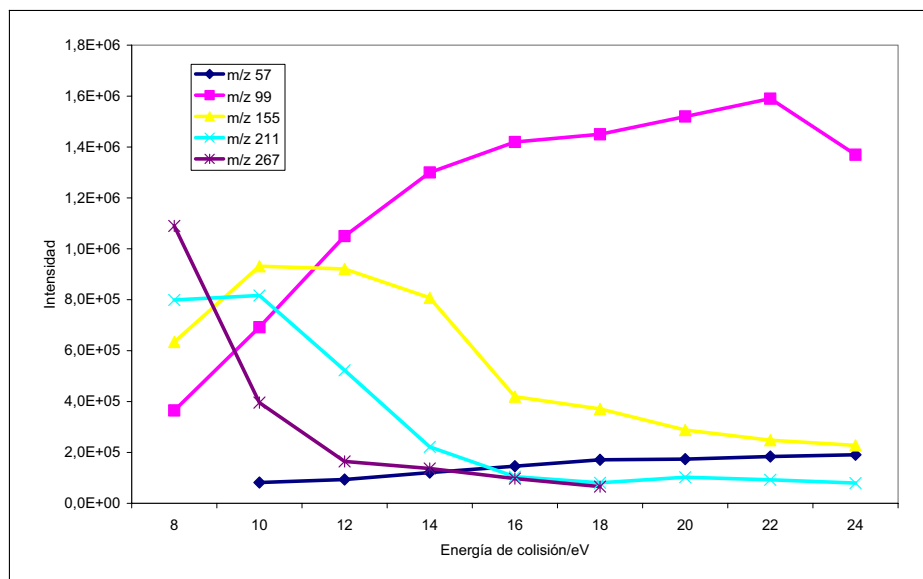


Figura IV.4.3. Optimización de la energía de colisión de MS/MS para el TnBP.

En el caso del RDP, debido a la escasa fragmentación del ion precursor se utilizó una transición pseudo-MRM. Mediante la infusión de una muestra de efluente (no con un patrón) se buscó la energía de colisión que producía la mayor relación señal/ruido, disminuyendo el ruido sin que llegue a caer la intensidad del ion molecular. Se obtuvo la mayor intensidad utilizando una energía de colisión de 10 eV, pero mayor relación señal/ruido a 25 eV. Se compararon los resultados de pseudo-MRM con los principales fragmentos, obteniendo las mayores relaciones señal/ruido para pseudo-MRM a 25 eV y para la transición a m/z 481, resultados como puede verse en la tabla IV.4.3 seleccionados para la cuantificación.

Las transiciones y los parámetros óptimos seleccionados para cada compuesto aparecen en la tabla IV.4.3. Para todos los compuestos se han seleccionado dos transiciones para su confirmación, excepto para el TPrP, que se utiliza como patrón interno, por lo que con una transición es suficiente.



Los espectros de MS/MS obtenidos para cada compuesto aparecen recogidos en el anexo I.

La fragmentación de los trialquil- y tricloroalquil- fosfatos tiene lugar mediante tres reagrupamientos McLafferty consecutivos, en los que se pierden los sustituyentes alquilo neutros quedando finalmente el ácido fosfórico protonado ( $m/z$  99) como catión final. En algunos casos, este proceso viene acompañado por un proceso de migración de carga al grupo alquilo que aparece como catión alquilo, mientras el ácido fosfórico o el mono- o diéster quedan como moléculas neutras. Como ejemplo puede verse en la figura IV.4.4 la fragmentación del TnBP.

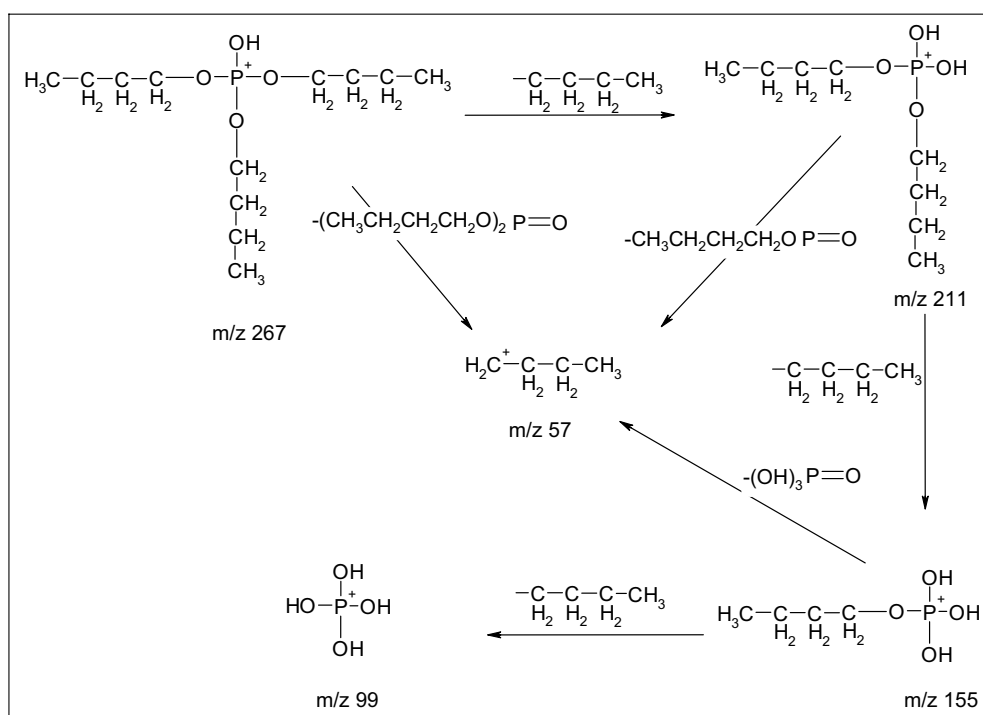


Figura IV.4.4. Esquema de la fragmentación del TnBP.

Para el trifenilfosfato (TPhP) el reagrupamiento McLafferty es menos favorable y en el espectro sólo aparece el fragmento  $m/z$  251 correspondiente al primer reagrupamiento, como puede verse en la figura

IV.4.5. Después tienen lugar dos pérdidas consecutivas de agua, dando lugar a  $m/z$  233 y 215. El fragmento  $m/z$  233 también puede producirse debido a la pérdida de un grupo fenol por el catión molecular. También puede producirse un reagrupamiento desde el catión molecular dando lugar al catión bifenilo,  $m/z$  153. Además se observa un pico de  $m/z$  77 que corresponde al catión arilo.

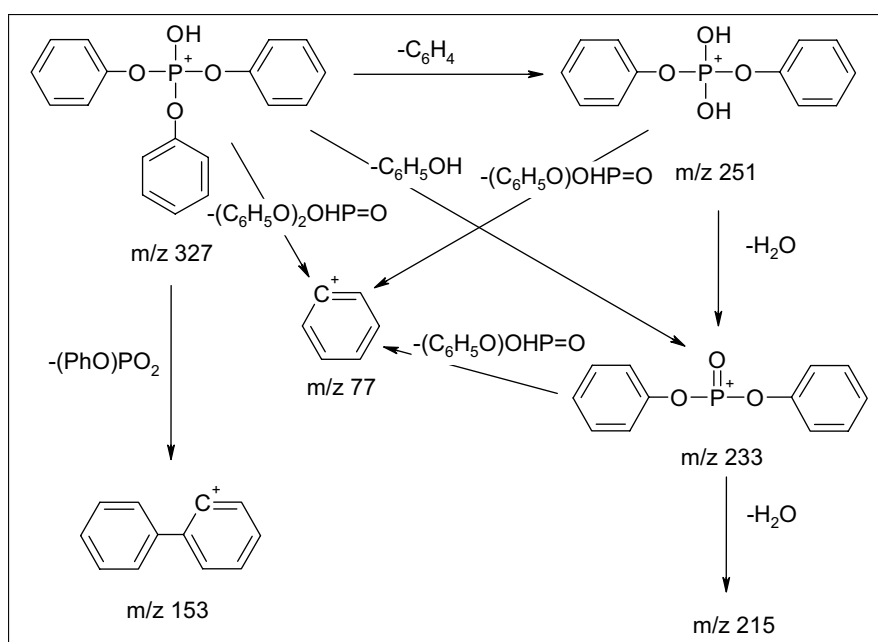


Figura IV.4.5. Esquema de la fragmentación del TPhP.

El RDP es muy estable y la fragmentación sólo tiene lugar a altas energías de colisión dando lugar a fragmentos poco intensos. Los iones más intensos que aparecen se deben a la pérdida de fenol,  $m/z$  481, y del monofeniléster del ácido fosfórico,  $m/z$  419.

Por el contrario, el BDP presenta dos fragmentos que se producen por división de un enlace entre el carbono central y uno de los anillos aromáticos,  $m/z$  367 y 327 (figura IV.4.6).

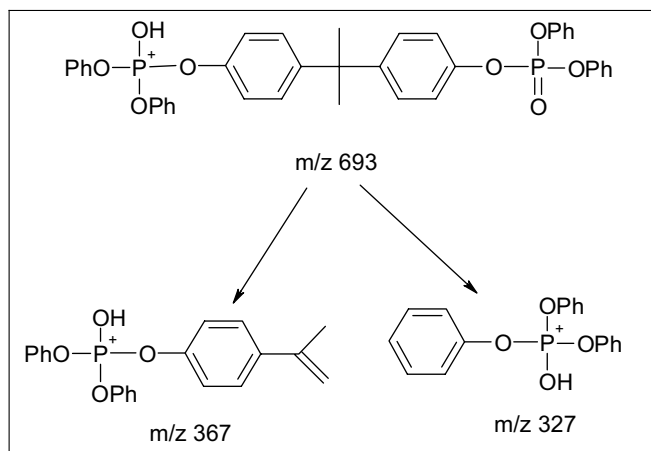


Figura IV.4.6. Esquema de la fragmentación del BDP.

El TPPO se fragmenta por un enlace fósforo-carbono; según dónde quede la carga positiva da lugar a fragmentos con una relación  $m/z$  201 o 77 (catión arilo).

#### IV.4.2.2.2. Optimización y espectro de MS/MS para los ésteres de fosfato mono- y di-sustituídos

Para la optimización de los parámetros de ESI-MS/MS se realizó la infusión de los patrones individuales en modo ESI negativo. En primer lugar, se optimizó el voltaje del cono, buscando la máxima señal del ión molecular desprotonado  $[M-H]^-$ . Como puede verse en la figura IV.4.7 para el MPhP, la máxima señal del ion molecular desprotonado ( $m/z$  173) se obtiene para un voltaje del cono de 20 V.

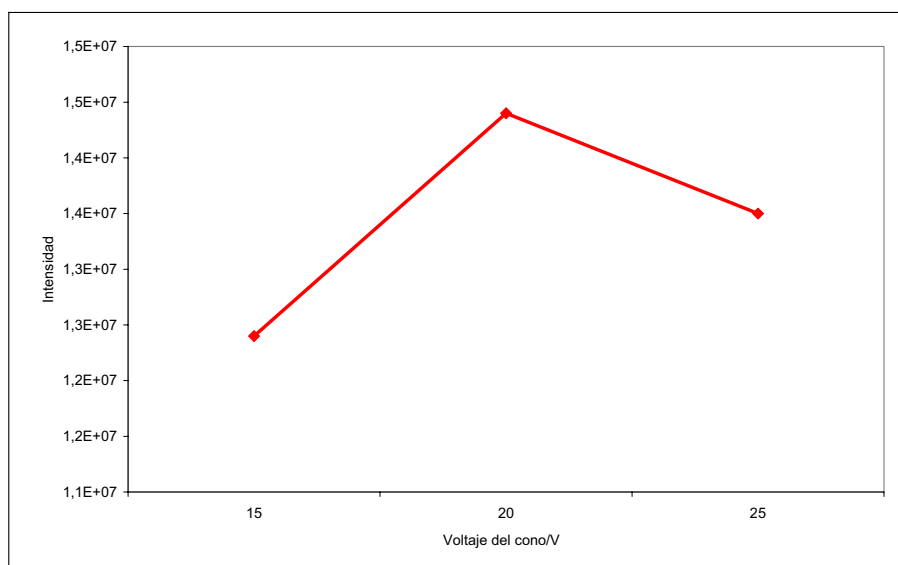


Figura IV.4.7. Optimización del voltaje del cono de ESI (modo negativo) del MPhP (m/z 173).

Una vez fijado el voltaje del cono para cada compuesto, se optimizó la energía de colisión. Como se muestra en la figura IV.4.8 para el MPhP, al aumentar la energía de colisión se produce una disminución de la señal del ion precursor desprotonado (m/z 173) y se obtiene el máximo del único ion producto (m/z 79) con una energía de colisión de 12 eV. Por lo tanto, sólo se puede seleccionar una transición para la cuantificación de este compuesto.

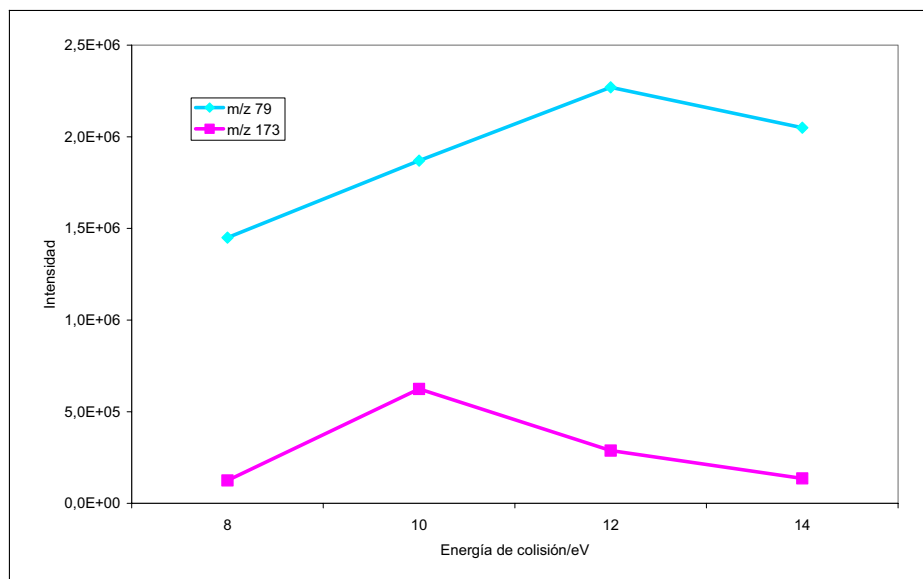


Figura IV.4.8. Optimización de la energía de colisión de MS/MS para el MPhP.

Las transiciones y los parámetros óptimos seleccionados para cada compuesto aparecen en la tabla IV.4.6. Para todos los compuestos se han intentado seleccionar dos transiciones, sin embargo para la mayoría de los ésteres de fosfato mono-sustituídos es imposible tener una segunda transición de confirmación. Para el DBzP se considera suficiente una transición, ya que se utiliza como patrón interno.

Los espectros de MS/MS obtenidos para cada compuesto en las condiciones óptimas aparecen recogidos en el anexo I.

Para los di-alquil fosfatos no clorados la fragmentación sigue un reagrupamiento McLafferty, seguido de la pérdida de un alcohol neutro, obteniéndose el anión fosfito a  $m/z$  79, como se muestra en la figura IV.4.9 para el DnBP.

De manera análoga, los mono-alquil fosfatos no clorados dan lugar a una única transición, dando lugar al ion fosfito ( $m/z$  79).

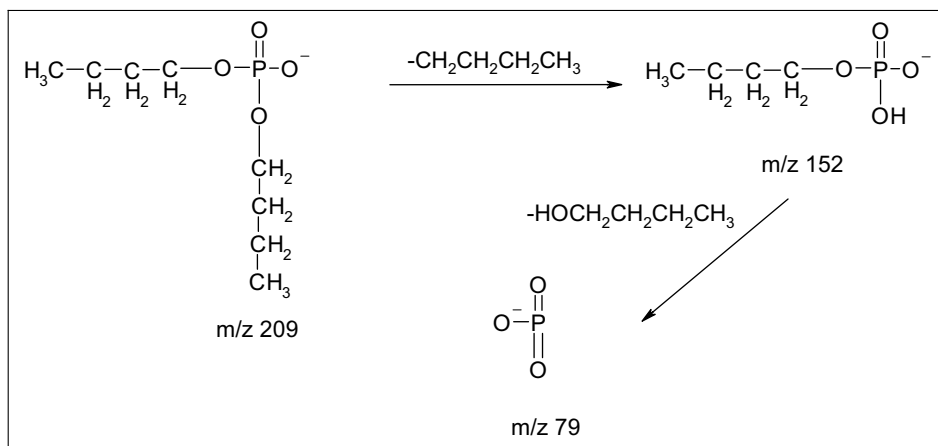


Figura IV.4.9. Esquema de la fragmentación del DnBP.

En el caso del DBEP, además se produce la pérdida de butanol del ion molecular dando lugar al anión m/z 223, tras lo cual puede sufrir también el reagrupamiento McLafferty (m/z 123) y la posterior pérdida del alcohol, dando lugar al ion fosfito (m/z 79).

Para los di-cloroalquil fosfatos la transición más intensa es la formación del anión cloruro, y con menor intensidad la pérdida de HCl, como se muestra en la figura IV.4.10 para el DCP. Sin embargo, para MCPP sólo tiene lugar la pérdida de HCl.

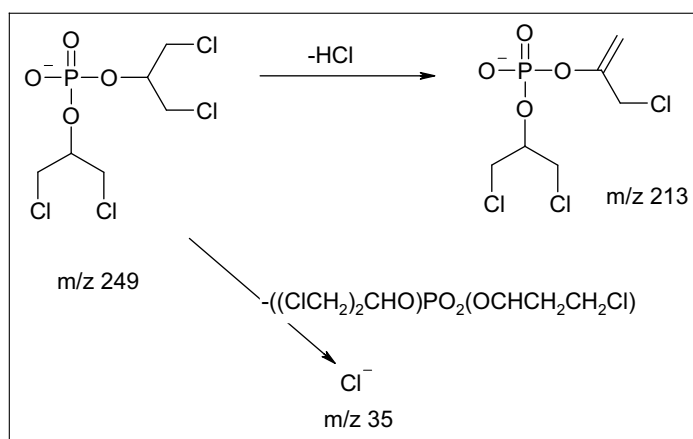


Figura IV.4.10. Esquema de la fragmentación del DCP.

Para los diaril fosfatos, de manera similar a los triaril fosfatos, el reagrupamiento McLafferty y la posterior pérdida del alcohol para la formación del anión fosfito ( $m/z$  79) es poco favorable. Los principales fragmentos que aparecen en el espectro se deben a la pérdida de un alcohol neutro (fenol o bencenometanol) y a la formación del anión correspondiente (anión fenol o anión bencenometanol) (figura IV.4.11). En el caso del MPhP se produce una simple transición al anión fosfito.

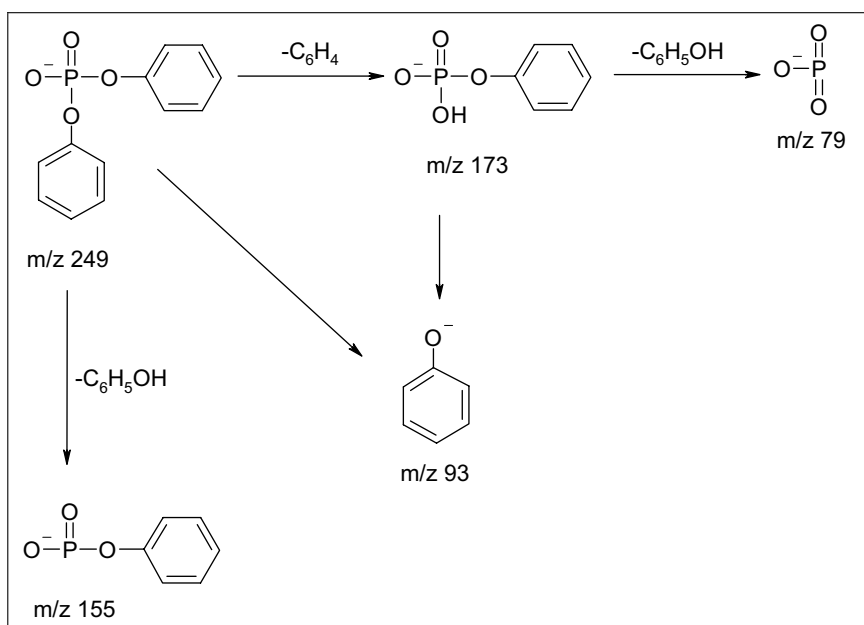


Figura IV.4.11. Esquema de la fragmentación del DPhP.

### IV.4.2.3. OPTIMIZACIÓN DE LA FASE MÓVIL E IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS

#### IV.4.2.3.1. Optimización de la separación de los TAPs

Para la separación de los analitos se utilizó cromatografía líquida en fase reversa usando como fase móvil metanol/agua con ácido fórmico

como modificador orgánico. La concentración del modificador se optimizó inyectando patrones individuales de cada compuesto y midiendo su respuesta, variando la cantidad de ácido fórmico entre 0 y 2%. Para todos los compuestos se observó un comportamiento similar y como puede verse en la figura IV.4.12, la mayor intensidad de la señal se obtuvo para concentraciones de ácido fórmico en el rango 0,05–0,2%. Se eligió el valor de trabajo de 0,2% ya que produce una mayor capacidad tamponadora y por lo tanto se espera que los resultados sean mas robustos.

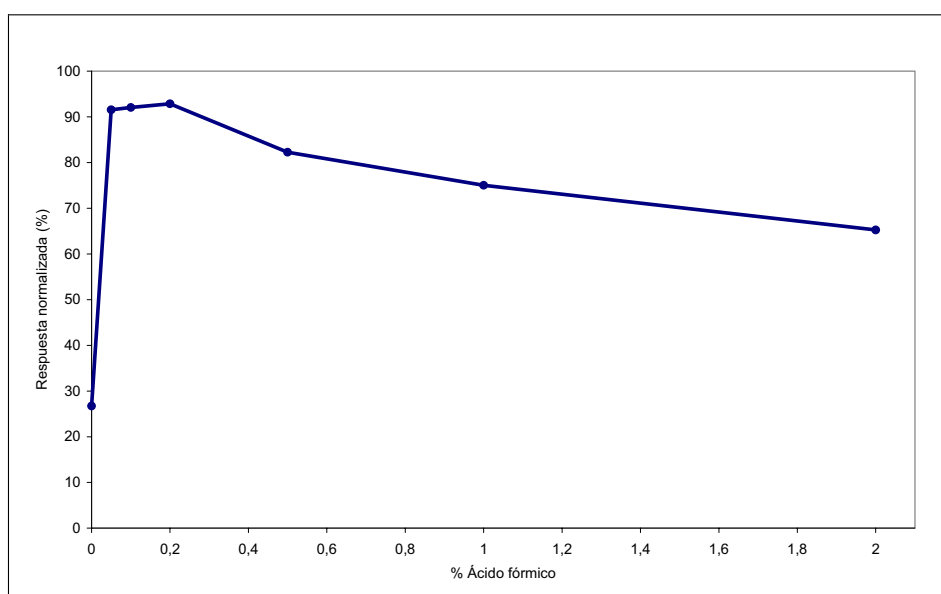


Figura IV.4.12. Influencia de la concentración de ácido fórmico en la respuesta media de todos los compuestos.

La identificación de los compuestos estudiados se muestra en la figura IV.4.13, que corresponde a un cromatograma de un patrón de 50  $\mu\text{g.L}^{-1}$  medido en MRM, según las condiciones de separación de la tabla IV.4.1 y las condiciones de MS/MS descritas en las tablas IV.4.2 y IV.4.3.



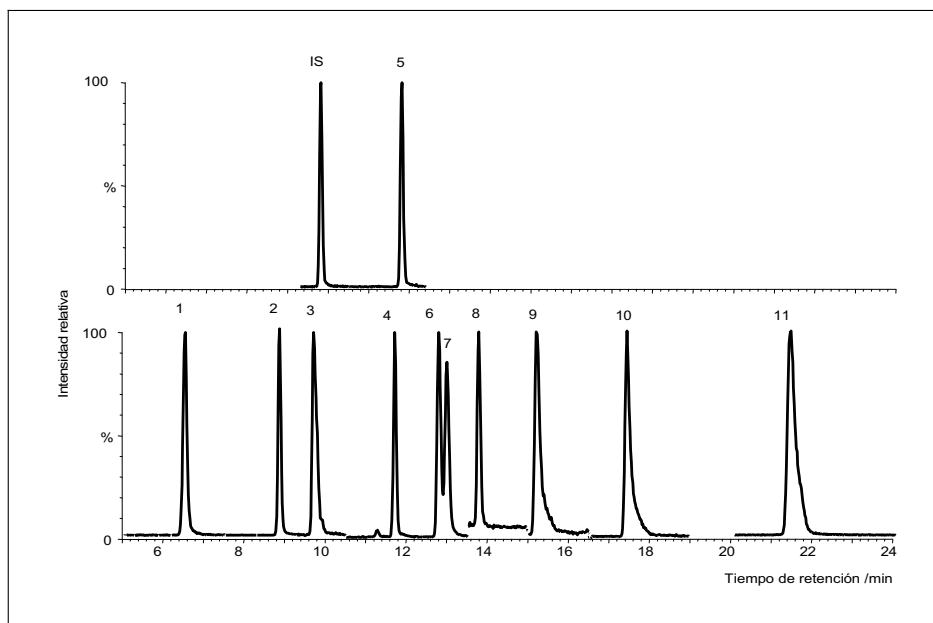


Figura IV.4.13. Cromatograma de LC-ESI-MS/MS de un patrón de  $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de TAPs; 1, TCEP; 2, TPPO; 3, TCPP; 4, TDCP; 5, TPhP; 6, TiBP; 7, TnBP; 8, TBEP; 9, RDP; 10, BDP; 11, TEHP; IS, TPrP.

Por lo tanto, el uso de LC-MS/MS permite la determinación de los trialquil-/arilfosfatos en un tiempo razonable ( $< 24$  min), además de los bisfosfatos, RDP y BDP, cuya determinación no es posible por GC.

#### IV.4.2.3.2. Optimización de separación de ésteres de fosfato mono-/di-sustituidos

Para la separación de los analitos se utilizó cromatografía de par iónico usando como fase móvil metanol/agua con tributilamina (TrBA), como reactivo formador de pares iónicos. La concentración de TrBA se optimizó inyectando patrones individuales de cada compuesto y midiendo su respuesta frente a la variación de concentración de TrBA entre 0–20 mM. Para todos los compuestos se observó un comportamiento similar, produciéndose una importante disminución de la respuesta cuando

aumenta la concentración de TrBA. La respuesta normalizada para la suma de los compuestos puede verse en la figura IV.4.14.

Se decidió utilizar TrBA 1 mM como concentración de compromiso entre la sensibilidad y la retención de los compuestos más ácidos y polares.

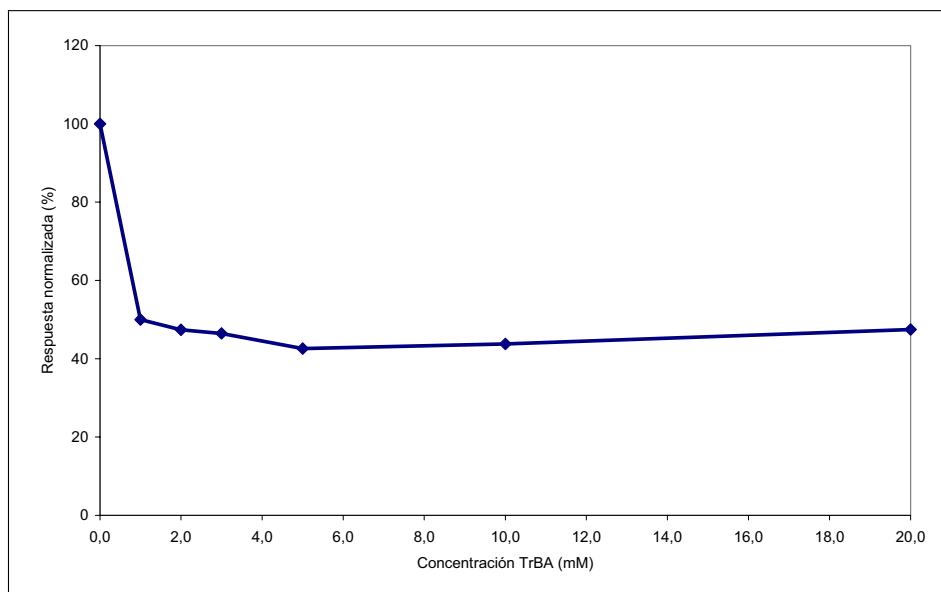


Figura IV.4.14. Influencia de la concentración de tributilamina en la respuesta media de todos los compuestos.

La identificación de los compuestos estudiados se muestra en la figura IV.4.15, que corresponde a un cromatograma de una mezcla de los productos de hidrólisis según las condiciones de separación de la tabla IV.4.4 y las condiciones de MS/MS descritas en las tablas IV.4.5 y IV.4.6.

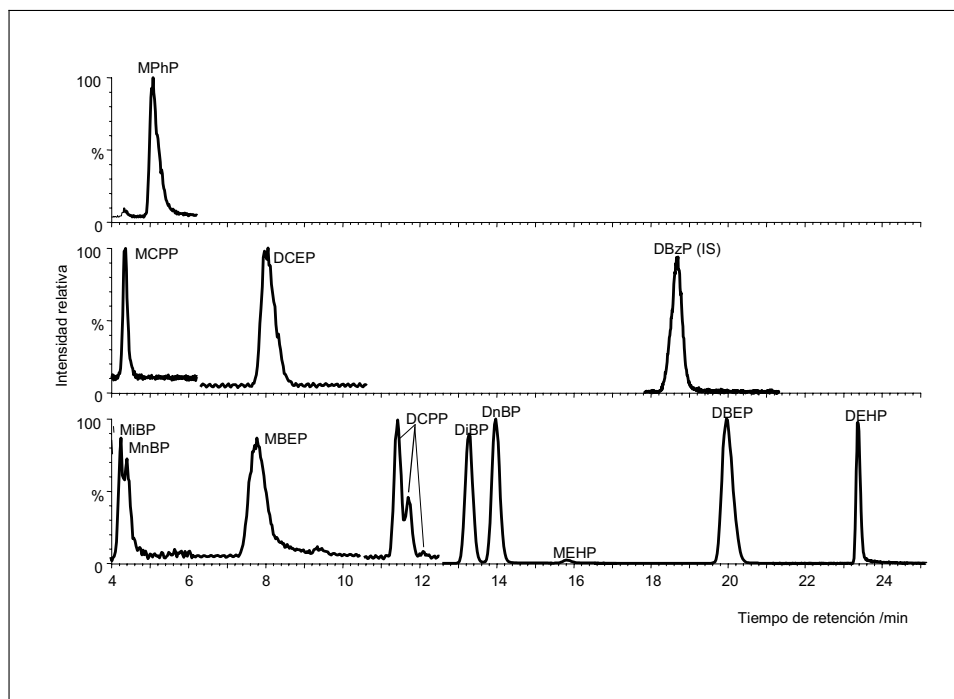


Figura IV.4.15. Cromatograma de LC-ESI-MS/MS de una mezcla de los ésteres mono-/di-sustituidos obtenidos como producto de hidrólisis.

Por lo tanto, el uso de LC de par iónico y MS/MS permite la determinación de los ésteres de fosfato mono- y di-sustituidos en menos de 24 min, sin una etapa previa de derivatización necesaria en GC.

#### IV.4.2.4. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN (SPE)

##### IV.4.2.4.1. Extracción de TAPs mediante SPE

Se evaluaron diferentes cartuchos de divinilbenceno-n-vinilpirrolidona (DVB-VP) OASIS HLB (60 mg), divinilbenceno-poliestireno (DVB-PS) Lichrolut EN (200 mg) y octadecilsilano (C18) Lichrolut RP-18 (500 mg) para la extracción de los pirorretardantes organofosforados.

En primer lugar se estudió el volumen de metanol necesario para la elución de los analitos de cada tipo de cartucho. En general, con menos de

6 mL se eluyen todos los compuestos, menos del cartucho de Lichrolut EN para el que se necesitan más de 8 mL, tal como se observa en la figura IV.4.16 para el TPPO, por lo que se descartó este cartucho.

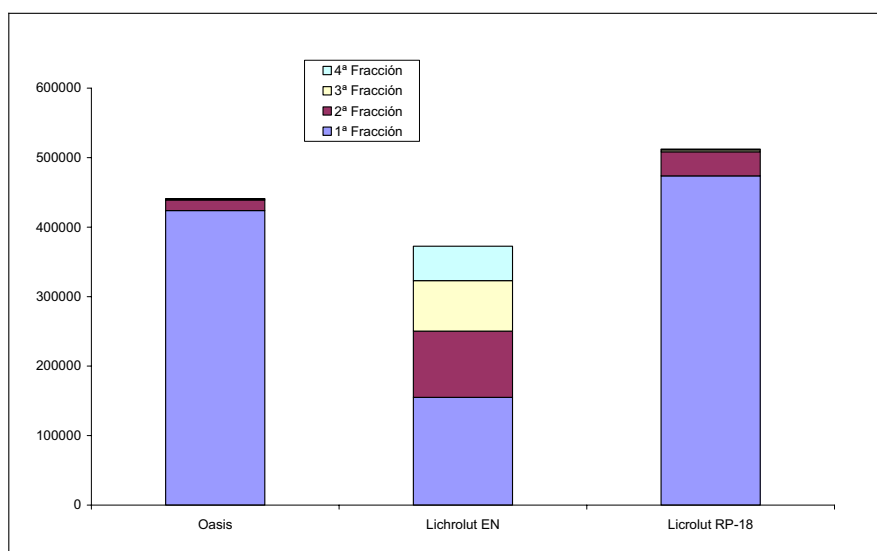


Figura IV.4.16. Estudio del volumen de elución para el TPPO.

A continuación, se estudio la recuperación y el efecto matriz que se produce durante el proceso de ionización en electrospray usando como muestra agua residual tratada. Como se ha realizado en trabajos anteriores<sup>9</sup>, para poder distinguir entre la recuperación real de SPE y el efecto matriz se evaluaron tres factores de respuesta obtenidos mediante: calibración externa con patrones en agua ultrapura (R1), adición estándar en los extractos de SPE (R2) y, por último, adición estándar en las muestras de agua residual antes de su extracción (R3). Los patrones se añadieron en tres niveles de concentración 0, 0,5 y 2,0  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  referidos a la muestra.

Por lo tanto, la relación entre el factor de respuesta de la adición estándar antes y después de la SPE (R3/R2) es una evaluación de la recuperación real del proceso de SPE, mientras la relación entre el factor de

respuesta de la adición estándar sobre los extractos de SPE y la calibración externa ( $R2/R1$ ) da una medida del efecto matriz.

Como puede verse en la tabla IV.4.7 las recuperaciones son mayores para el cartucho OASIS HLB que para el RP-18, y el efecto matriz es similar. Por lo tanto, tras la evaluación de estos dos cartuchos se eligió el cartucho OASIS HLB para la extracción de los pirorretardantes organofosforados de aguas mediante SPE.

Tabla IV.4.7. Comparación de las recuperaciones (%) de SPE ( $R3/R2$ ) y efecto matriz ( $R2/R1$ ) en muestras de agua para los cartuchos Lichrolut RP-18 y Oasis HLB.

Compuesto	Recuperación (%)		Efectos de matriz (%)	
	RP-18	OASIS HLB	RP-18	OASIS HLB
TCEP	73	82	109	112
TPPO	69	90	138	131
TCPP	60	83	160	166
TDCP	60	75	141	139
TPhP	43	65	174	160
TiBP	49	66	187	189
TnBP	43	69	160	208
TBEP	47	71	176	153
TEHP	21	28	203	131

Las recuperaciones para los compuestos más hidrofóbicos (TEHP) son bajas (tabla IV.4.7). Para intentar mejorarlas se decidió lavar la botella de la muestra y los tubos del sistema de extracción dos veces con 5 mL de metanol tras la extracción, y posteriormente se transfirieron a los cartuchos de SPE para su elución.

#### IV.4.2.4.2. Extracción de los ésteres de fosfato mono-/di-sustituídos mediante SPE

De igual manera que para los TAPs, se evaluaron diferentes cartuchos OASIS HLB (60 mg), Lichrolut EN (200 mg) y Lichrolut RP-18 (500 mg) para la extracción de los ésteres de fosfato mono- y di-sustituídos disponibles comercialmente, pero en este caso es necesaria la acidificación de las muestras a pH 2.

En primer lugar se estudió el volumen de metanol necesario para la elución de los compuestos de cada tipo de cartucho. Se descartó el cartucho de Lichrolut EN debido a la dificultad para eluir los compuestos, como puede comprobarse en la figura IV.4.17 para el DnBP.

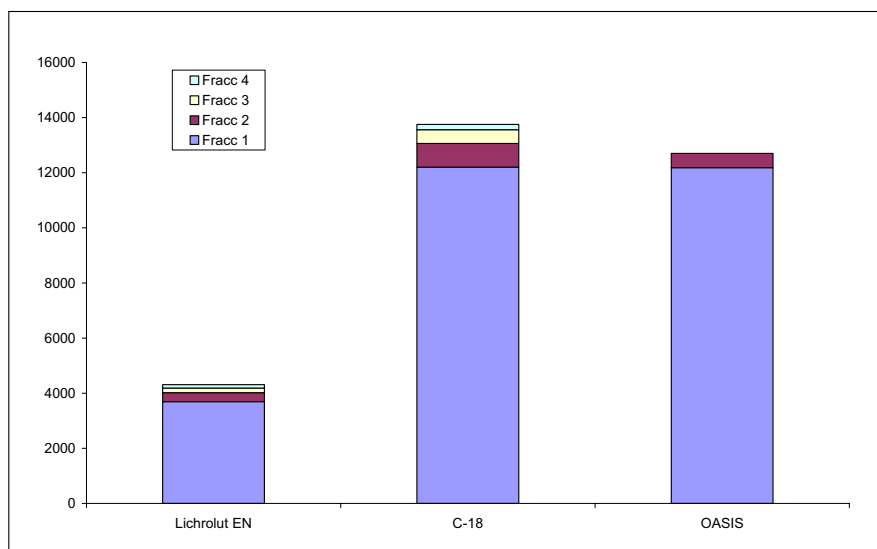


Figura IV.4.17. Estudio del volumen de elución para el DnBP.

Por lo tanto, se consideraron los otros 2 cartuchos y la posibilidad de utilizar la formación de par iónico adicionando TrBA a las muestras. Se evaluaron las recuperaciones y el efecto matriz como se ha indicado para los ésteres de fosfato trisustituídos en el apartado IV.4.2.4.1, añadiendo los

patrones en tres niveles de concentración 0, 0,2 y 1,0  $\mu\text{g.L}^{-1}$  referidos a la muestra.

Por lo tanto, la relación entre el factor de respuesta de la adición estándar antes y después de la SPE ( $R3/R2$ ) es una medida de la recuperación del proceso de SPE, mientras la relación entre el factor de respuesta de la adición estándar sobre los extractos de SPE y la calibración externa ( $R2/R1$ ) da una medida del efecto matriz.

Como puede verse en la tabla IV.4.8, las recuperaciones son satisfactorias utilizando cualquier cartucho y cualquier mecanismo, a excepción del DEHP, para el que la recuperación tras la acidificación de la muestra es baja, mientras con el uso del par iónico se obtiene una buena recuperación. Además, se observa una menor supresión de la señal usando par iónico. Por lo tanto, para la extracción de muestras se utilizaron los cartuchos RP-18 con la formación de par iónico.

Tabla IV.4.8.Comparación de las recuperaciones (%) de SPE ( $R3/R2$ ) y efecto matriz ( $R2/R1$ ) en muestras de agua para los cartuchos Oasis HLB y Lichrolut RP-18, en fase inversa o por par iónico.

Compuesto	Recuperación (%)			Efectos de matriz (%)		
	RP-18	OASIS HLB	RP-18 Par ionico	RP-18	OASIS HLB	RP-18 Par ionico
DnBP	111	80	123	50	72	73
DPhP	94	75	123	86	91	102
DEHP	36	30	109	58	50	79

#### IV.4.2.5. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE MATRIZ

Los efectos de matriz son uno de los principales problemas que se pueden producir con la técnica LC-ESI-MS, debido a la supresión de la señal que tiene lugar durante el proceso de ionización, y puede suponer una de las fuentes de error sistemático más importantes<sup>10</sup>.

Para evaluar los efectos de matriz se realizó el mismo proceso indicado en el apartado IV.4.2.4 con agua residual tratada (efluente) y sin tratar (influyente), determinando R2/R1 (relación entre el factor de respuesta de la adición estándar sobre los extractos de SPE y la calibración externa).

Para las muestras de agua residual tratada (efluente), para la mayoría de los TAPs el efecto de matriz es menor del 20%, es decir, la respuesta normalizada en la figura IV.4.18 se encuentra entre 80 y 120%, excepto para el TCPP, RDP, BDP y TEHP. Pero en todos los casos el efecto matriz es menor del 50%. Sin embargo, para muestras de agua residual sin tratar (influyente) los efectos de matriz son más fuertes, entre 11-74%. Además, los efectos de matriz son completamente diferentes para los diferentes analitos en las muestras, por lo que no pueden predecirse.



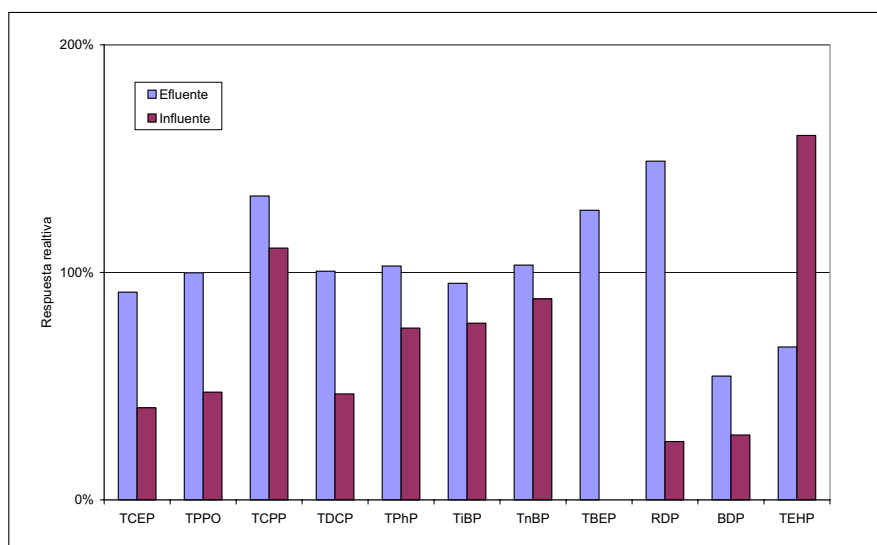


Figura IV.4.18. Estudio de los efectos de matriz en LC-ESI-MS/MS de los TAPs. Relación de la respuesta de los analitos añadidos a extractos de agua residual (R2) y de los analitos en solución acuosa (R1).

Para los tres diaquil-/arilfosfatos estudiados, los efectos de matriz producen una supresión de la señal tanto en las muestras de agua residual tratada (efluente) como no tratada (influyente). En algunos casos, como se muestra en la figura IV.4.19, los efectos de matriz llegan a reducir la señal un 50 %.

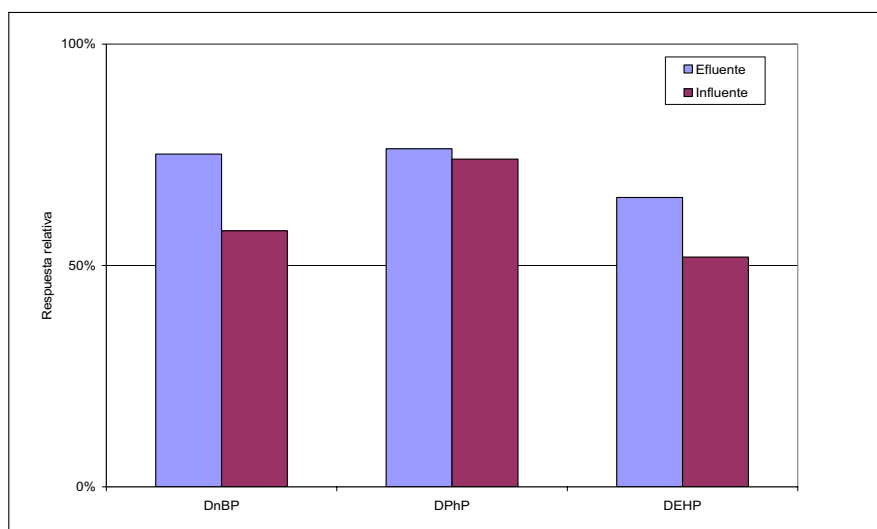


Figura IV.4.19. Estudio de los efectos de matriz en LC-ESI-MS/MS de DAPs. Relación de la respuesta de los analitos añadidos a extractos de agua residual (R2) y de los analitos en solución acuosa (R1).

El uso de patrón interno no compensa estos efectos de matriz, por lo que, para la cuantificación de las muestras debe usarse el método de adición estándar.

#### IV.4.2.6. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

##### IV.4.2.6.1. Estudio de los parámetros analíticos para los TAPs

Se evaluó la linealidad, precisión y límites de cuantificación y detección del método LC-MS/MS para la determinación de TAPs. Los valores obtenidos aparecen reflejados en la tabla IV.4.9.

Se estudió la linealidad del método LC-MS/MS para disoluciones acuosas de patrones en el rango  $5-500 \mu\text{g.L}^{-1}$ , utilizando el TPrP como patrón interno a una concentración de  $200 \mu\text{g.L}^{-1}$ , obteniendo coeficientes de correlación para todos los compuestos entre 0,986-0,999.

Los límites de cuantificación del método LC-MS/MS para muestras de agua residual, calculados para una relación señal ruido igual a 10, permiten la posible detección mediante inyección directa de las muestras acuosas sin previa extracción al nivel de bajo  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , ya que se encuentran en el rango 0,13–3,7  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .

La repetibilidad se estudió mediante 5 inyecciones directas en el sistema LC-MS/MS de un patrón de 50  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , obteniendo un coeficiente de variación menor de 13% para todos los compuestos.

Tabla IV.4.9. Parámetros de validación del método LC-MS/MS en modo positivo para los TAPs.

Compuesto	Linealidad/ $r^{(a)}$	Repetibilidad/ RSD (%) <sup>(b)</sup>	LOD/ $\mu\text{g.L}^{-1}$ (c)	LOQ/ $\mu\text{g.L}^{-1}$ (d)
TCEP	0,9960	10	0,48	1,58
TPPO	0,9969	5	0,04	0,13
TCPP	0,9992	9	0,26	0,87
TDCP	0,9954	5	0,29	0,99
TPhP	0,9986	8	0,44	1,47
TiBP	0,9975	9	0,44	1,45
TnBP	0,9850	12	0,27	0,91
TBEP	0,9992	4	0,38	1,27
RDP	0,9940	4	1,00	3,34
BDP	0,9938	4	1,10	3,68
TEHP	0,9865	13	0,05	1,72

(a) Calibración a 6 niveles (5–500  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), con un concentración de patrón interno (TPhP) de 200  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (b) patrón de 50  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (n=5); (c) definido para una relación señal/ruido (s/n) de 3; (d) definido para una relación señal/ruido (s/n) de 10.

Se evaluaron los parámetros analíticos de exactitud y límites de detección y cuantificación del método SPE-LC-MS/MS para la determinación

de TAPs en muestras de agua. Los resultados se muestran en la tabla IV.4.10.

Se estudió la recuperación del método SPE-LC-MS/MS con agua ultrapura con niveles de adición de 0,1 y 1  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , y con agua residual tratada (efluente) y sin tratar (influyente) con un nivel de adición de 4  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (n=4). El estudio de la recuperación del RDP y BDP no se realizó en el nivel bajo de adición (0,1  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) debido a que estos compuestos presentan mayor límite de cuantificación y, además, no están disponibles como patrones puros, por lo que las extracciones de estos compuestos para el cálculo de las recuperaciones se realizó de manera separada.

La cuantificación se realizó utilizando el método de la adición estándar con patrón interno sobre los extractos, debido a los efectos de matriz. Se obtuvieron recuperaciones aceptables para todos los compuestos con valores en el intervalo 50–128%. Para el TEHP se obtuvieron las recuperaciones más bajas probablemente debido a su hidrofobicidad.

Los límites de cuantificación para muestras de agua residual tratada están en el rango de 3–81  $\text{ng.L}^{-1}$ , siendo adecuados para la determinación de estos compuestos en muestras de agua.

Tabla IV.4.10. Estudio de la recuperación y de los límites de detección y cuantificación del procedimiento SPE-LC-MS/MS.

Compuesto	Recuperaciones (n=4)/% (a)				LOD/ ng.L <sup>-1</sup> (b)	LOQ/ ng.L <sup>-1</sup> (c)
	Agua (0,1µg.L <sup>-1</sup> )	Agua (1µg.L <sup>-1</sup> )	Agua residual tratada (4µg.l <sup>-1</sup> )	Agua residual (4µg.l <sup>-1</sup> )		
TCEP	74 (7)	89 (2)	106 (2)	95 (5)	10	35
TPPO	78 (8)	88 (2)	107 (2)	91 (4)	1	3
TCPP	74 (8)	87 (3)	103 (4)	97 (5)	6	19
TDCP	76 (8)	89 (1)	107 (3)	85 (1)	6	22
TPhP	63 (8)	71 (2)	101 (3)	95 (4)	10	32
TiBP	75 (12)	60 (2)	62 (3)	106 (7)	10	32
TnBP	65 (11)	69 (4)	66 (1)	90 (2)	6	20
TBEP	76 (4)	75 (3)	104 (4)	(d)	8	28
RDP	-	89 (6)	128 (5)	100 (23)	22	73
BDP	-	108 (11)	103 (10)	105 (15)	24	81
TEHP	51 (4)	70 (1)	67 (16)	50 (3)	11	38

(a) Expresado como: % Recuperación (RSD); (b) definido para una relación señal/ruido (s/n) de 3; (c) definido para una relación señal/ruido (s/n) de 10; (d) no se puede determinar la recuperación porque la concentración en la muestra es 3 veces mayor que la cantidad adicionada.

#### IV.4.2.6.2. Estudio de los parámetros analíticos para los DAPs

Los parámetros analíticos del método LC-MS/MS, linealidad, precisión, y límites de detección y cuantificación, se muestran en la tabla IV.4.11.

Se estudió la linealidad del método LC-MS/MS para disoluciones acuosas de patrones en el rango 2-500 µg.L<sup>-1</sup>, utilizando el DBzP como patrón interno a una concentración de 200 µg.L<sup>-1</sup>, obteniendo coeficientes de correlación para todos los compuestos entre 0,9987-0,9991.

La repetibilidad se estudió mediante 5 inyecciones directas en el sistema LC-MS/MS de un patrón de 20 µg.L<sup>-1</sup>, obteniéndose un coeficiente de variación menor de 6% para todos los compuestos.

Los límites de cuantificación del método LC-MS/MS, 0,46-0,81 µg.L<sup>-1</sup>, permiten el análisis mediante inyección directa de los compuestos, sin previa extracción, a nivel de µg.L<sup>-1</sup>.

Tabla IV.4.11. Parámetros de validación del método LC-MS/MS en modo positivo para los DAPs y MAPs.

Compuesto	Linealidad/ r <sup>(a)</sup>	Repetibilidad/ RSD (%) <sup>(b)</sup>	LOD/ µg.L <sup>-1</sup> <sup>(c)</sup>	LOQ/ µg.L <sup>-1</sup> <sup>(d)</sup>
DnBP	0,9991	5,3	0,23	0,78
DPhP	0,9981	1,9	0,14	0,46
DEHP	0,9987	1,3	0,24	0,81

(a) Calibración a 6 niveles (2-500 µg.L<sup>-1</sup>), con un concentración de patrón interno (DBzP) de 200 µg.L<sup>-1</sup> (b) patrón de 20 µg.L<sup>-1</sup> (n=5); (c) definido para una relación señal/ruido (s/n) de 3; (d) definido para una relación señal/ruido (s/n) de 10.

En la tabla IV.4.12 se muestran los valores de recuperación y límites de detección y cuantificación del método SPE-LC-MS/MS para la determinación de DAPs y MAPs en muestras de agua.

Los límites de cuantificación del método SPE-LC-MS/MS para muestras de agua residual tratada, calculados para una relación señal/ruido igual a 10, están en el rango 7,1-14 ng.L<sup>-1</sup>.

Se estudió la recuperación del método SPE-LC-MS/MS con agua ultrapura con niveles de adición de 0,05 y 1 µg.L<sup>-1</sup>, y con agua residual tratada (efluente) y sin tratar (influyente) con un nivel de adición de 4 µg.L<sup>-1</sup> (n=4).

La cuantificación se realizó por el método de la adición estándar con patrón interno sobre los extractos, debido a los efectos de matriz, obteniendo recuperaciones aceptables para todos los compuestos, mayores del 70% en todos los casos.

Tabla IV.4.12. Estudio de la recuperación y de los límites de detección y cuantificación del procedimiento SPE-LC-MS/MS para la determinación de DAPs y MAPs.

Compuesto	Recuperaciones (n=4)/% <sup>(a)</sup>				LOD/ ng.L <sup>-1</sup> <sup>(b)</sup>	LOQ/ ng.L <sup>-1</sup> <sup>(c)</sup>
	Agua (0,05µg.L <sup>-1</sup> )	Agua (1µg.L <sup>-1</sup> )	Agua residual tratada (4µg.L <sup>-1</sup> )	Agua residual (4µg.L <sup>-1</sup> )		
DnBP	80 (13)	97 (7)	93 (2)	71 (8)	4,1	14
DPhP	88 (13)	98 (6)	81 (1)	85 (8)	2,1	7,1
DEHP	82 (13)	76 (14)	112 (8)	71 (10)	4,2	14

(a) Expresado como: % Recuperación (RSD); (b) definido para una relación señal/ruido (s/n) de 3; (c) definido para una relación señal/ruido (s/n) de 10.

Para el MPhP, disponible comercialmente, se obtuvieron recuperaciones del 74% para agua milli-Q con una adición de 1 µg.L<sup>-1</sup>. Sin embargo, no se utilizó para posteriores experimentos debido a problemas de degradación de los patrones.

#### IV.4.2.7. APLICACIÓN A MUESTRAS REALES

Los métodos desarrollados se aplicaron al análisis de aguas de una planta municipal de tratamiento de aguas residuales, tanto a agua residual sin tratar (influyente), como al efluente primario y terciario.

La cuantificación se realizó por el método de la adición estándar con patrón interno sobre los extractos, debido a los efectos de matriz.

Como se muestra en la tabla IV.4.13, se detectaron 7 TAPs en todas las muestras de agua, en concentraciones que variaban entre 25 ng.L<sup>-1</sup>, para TPPO, hasta 12 µg.L<sup>-1</sup>, para TBEP.

Tabla IV.4.13. Concentración de los TAPs encontrados en las aguas de una planta municipal de tratamiento de aguas residuales.

Compuesto	Agua residual no tratada (µg.L <sup>-1</sup> ) (n=3)	Efluente Primario (µg.L <sup>-1</sup> ) (n=3)	Efluente Terciario (µg.L <sup>-1</sup> ) (n=3)
TCEP	0,33 (0,01)	0,39 (0,03)	0,35 (0,02)
TPPO	0,026 (0,004)	0,025 (0,001)	0,046 (0,001)
TCPP	3,1 (0,1)	2,4 (0,2)	2,6 (0,1)
TDCP	0,21 (0,01)	0,18 (0,01)	0,13 (0,01)
TPhP	nd	nd	nd
TiBP	*	*	*
TnBP	0,59 (0,01)	0,69 (0,01)	0,13 (0,01)
TBEP	12,06 (1)	11,4 (1)	0,067 (0,013)
RDP	nd	nd	nd
BDP	nd	nd	nd
TEHP	nd	nd	nd

Expresado como: Concentración µg.L<sup>-1</sup> (desviación estándar); nd = menor a los LODs; \*= no fue posible su cuantificación por problemas de contaminación.

Como puede verse en la tabla IV.4.14, se detectaron 6 posibles productos de hidrólisis de los TAPs en las muestras de agua, 5 de ellos disustituidos y uno monosustituido. Tres de los compuestos pudieron ser cuantificados debido a la disponibilidad de patrones comerciales, encontrando concentraciones entre 27 ng.L<sup>-1</sup>, para DnBP, hasta 62 µg.L<sup>-1</sup>, para DEHP. Las concentraciones de los otros tres compuestos no pudieron



ser calculadas, pero las áreas obtenidas en LC-MS/MS también aparece en la tabla IV.4.14.

Tabla IV.4.14. Concentración de los productos de hidrólisis en las aguas de una planta municipal de tratamiento de aguas residuales.

Compuesto	Agua residual no tratada ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) (n=3)	Efluente Primario ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) (n=3)	Efluente Terciario ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) (n=3)
DnBP	1,6 (0,1)	1,8 (0,1)	0,027 (0,006)
DPhP	0,18 (0,01)	0,20 (0,01)	0,050 (0,005)
DEHP	61 (5)	62 (1)	4,7 (0,2)
DiBP*	1757	1542	113
MEHP*	67127	75281	14879
DBEP*	667	121	nd

Expresado como: Concentración  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (desviación estándar); nd = no detectado; \*= expresado en área ya que no fue posible su cuantificación por que los patrones no están disponibles.

Como puede observar en las tablas IV.4.13 y IV.4.14, la concentración de los analitos en el agua residual sin tratar (influyente) es bastante elevada para algunos compuestos ( $12 \mu\text{g.L}^{-1}$  para TBEP y  $62 \mu\text{g.L}^{-1}$  para DEHP).

De los resultados obtenidos también puede deducirse que en el tratamiento de aguas se produce una importante disminución de la concentración de los analitos organofosforados, es decir, son degradados en el proceso de tratamiento de aguas, principalmente en el segundo paso de tratamiento biológico y no en el primer paso de sedimentación, excepto para los cloroalquilfosfatos y TPPO. De todas maneras, para algunos compuestos la concentración en el agua residual tratada (efluente terciario) sigue siendo elevada ( $2,6 \mu\text{g.L}^{-1}$  para TCPP y  $4,7 \mu\text{g.L}^{-1}$  para DEHP).

En las figuras IV.4.20 y IV.4.21 aparecen dos cromatogramas de TAPs y productos de degradación, respectivamente, de una muestra de agua residual tratada (efluente) y una muestra de agua residual sin tratar (influyente).

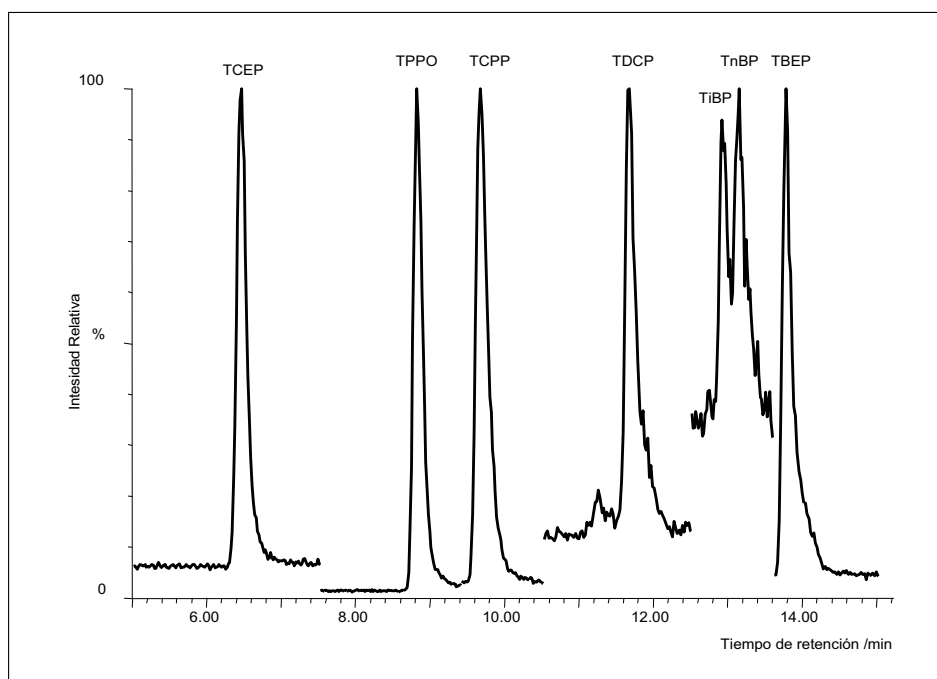


Figura IV.4.20. Cromatograma de una muestra de agua residual tratada, determinada mediante SPE-LC-MS/MS, para la determinación de TAPs.

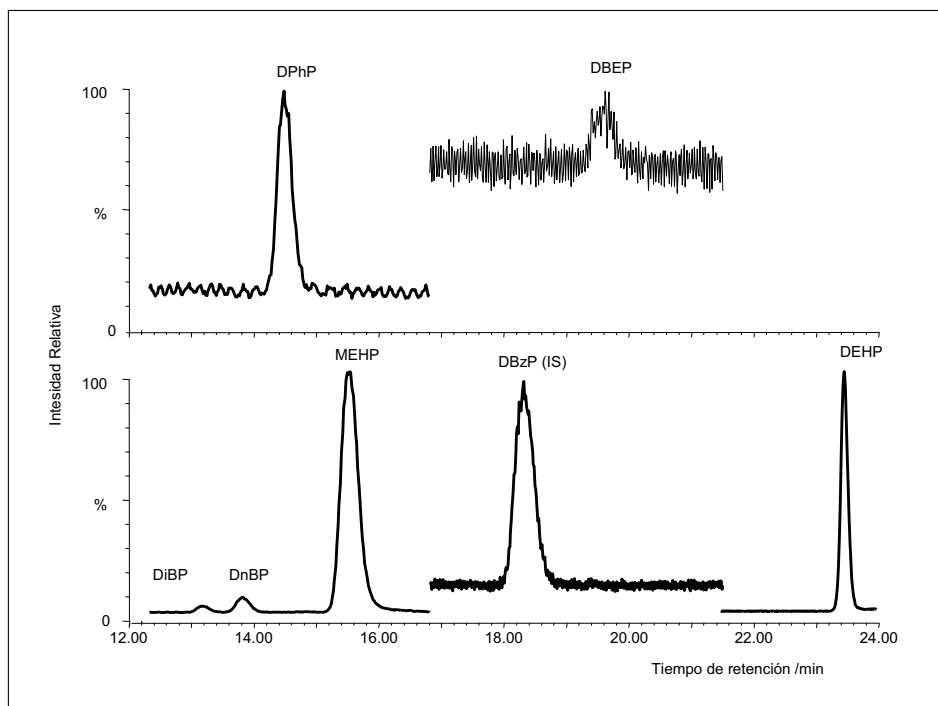


Figura IV.4.21. Cromatograma de una muestra de agua residual sin tratar, determinada mediante SPE-LC-MS/MS, para la determinación de los productos de hidrólisis de los TAPs.

#### IV.4.2.8. ESTUDIO DE BIODEGRADACIÓN

Los estudios de biodegradación se realizaron con los compuestos TPhP, TiBP y TBEP, ya que sus posible productos de biodegradación fueron encontrados en las muestras y a diferencia de otros compuestos encontrados como MEHP y DEHP<sup>6</sup>, no se producen industrialmente.

Las concentraciones máximas en disolución acuosa no coinciden con las concentraciones añadidas ( $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) debido a la relativa hidrofobicidad de los ésteres de fosfato tri-sustituídos.

Los resultados obtenidos tras el análisis de las muestras tomadas (figura IV.4.22) están de acuerdo con los datos de la bibliografía<sup>11</sup>. Se observó que el TPhP (A) se degrada rápidamente; después de un día casi no

queda TPhP en disolución, formándose DPhP, pero degradándose rápidamente a partir del tercer día.

La degradación de los tri-álquil fosfatos (B) es más lenta que para el TPhP, necesitando un tiempo de 15 días. En la figura IV.4.22 (B) se observa la progresiva degradación del TBEP y la formación de DBEP con un máximo de concentración alrededor de los 15 días.

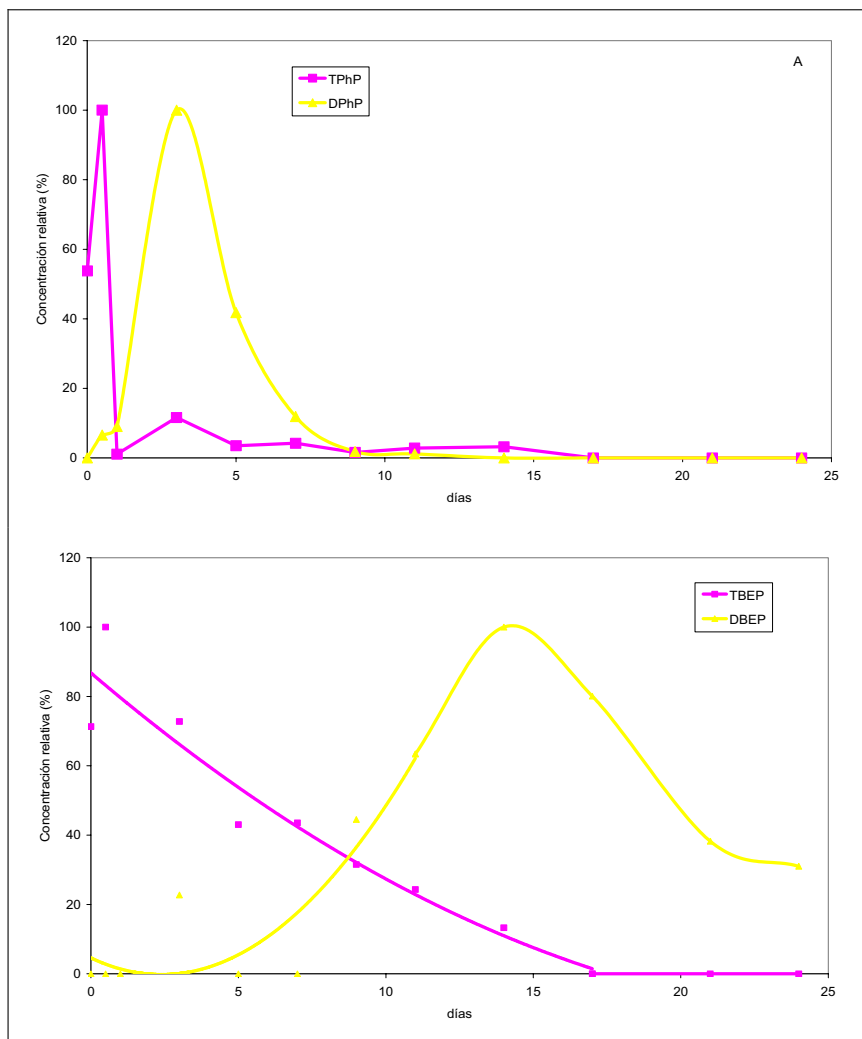


Figura IV.4.22. Patrón de degradación de los ésteres de fosfato tri-sustituidos en la prueba de degradación; A, TPhP; B, TBEP.

En las botellas que contenían sales de Hg(II) no se observa la degradación de TiBP y TBEP, ni la formación de dialquil fosfatos. Sin embargo, sí se observa una lenta degradación de TPhP y la formación de DPhP, que puede atribuirse a alguna actividad biológica remanente.

Por lo tanto, estos resultados indican que la degradación biológica podría ser una fuente de ésteres de fosfato di-sustituidos en el medioambiente.

- 
1. Lebel, G.L.; Williams, D.T.; Benoit, F.M., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **64** (1981) 991–998.
  2. Fries, E.; Pittmann, W., *J. Environ. Monit.* **3** (2001) 621–626.
  3. Jonsson, O.B.; Nilsson, U.L., *J. Sep. Sci.* **26** (2003) 886–892.
  4. Toda, H.; Sako, K.; Yagome, Y.; Nakamura, T., *Anal. Chim. Acta* **519** (2004) 213–218.
  5. BUA Stoffberichte 108. Tributylphosphat/dibutylphosphat (1992).
  6. BUA Stoffberichte 172. Di(2-ethylhexyl)phosphat/tri(2-ethylhexyl)phosphate (1997).
  7. Muir, D.C.G.; Grift, N.P., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **66** (1983) 684–690.
  8. ISO 7827, In: German Standard methods for the determination of water, wastewater and sludge, Beuth Verlag, Berlin (1995).
  9. Kloepper, A.; Jekel, M.; Reemtsma, T., *J. Chromatogr. A* **1058** (2004) 81–88.
  10. Reemtsma, T., *Trends Anal. Chem.* **20** (2001) 533–543.
  11. Kawagoshi, Y.; Nakamura, S.; Fukunaga, I., *Chemosphere* **48** (2002) 219–225.



#### **IV.5. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS CLORADOS Y BROMADOS EN MUESTRAS DE ACUICULTURA**

En este trabajo se estudian diferentes técnicas de extracción para la determinación de contaminantes halogenados (plaguicidas organoclorados, bifenilos policlorados, bifenilos polibromados y éteres de difenilo bromados) en muestras de acuicultura (piensos, peces y moluscos) mediante cromatografía de gases.

El estudio de estos contaminantes en la acuicultura es muy importante debido al gran crecimiento que está experimentando este sector, y que constituye una fuente de riesgo muy importante<sup>1,2</sup>. La exposición a los compuestos halogenados ha estado sujeto a extensas discusiones y se ha regulado su presencia en los productos pesqueros y en los productos de alimentación de animales<sup>3,4,5,6</sup>.

Se han desarrollados dos métodos de extracción de muestras: extracción con fluidos supercríticos (SFE) y extracción basada en la dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD), buscando métodos rápidos, que en un solo paso permitan la extracción y limpieza de los extractos usando adsorbentes, y disminuyendo el consumo de disolventes frente a las técnicas de extracción tradicionales.

Además, se ha estudiado el uso de la microextracción en fase sólida (SPME) como técnica de preconcentración de los extractos antes de su inyección en el sistema cromatográfico, con el fin de aumentar la sensibilidad.

Estas técnicas de extracción y preconcentración se han aplicado a la determinación de compuestos clorados y bromados en muestras de piensos y muestras sólidas biológicas provenientes de la acuicultura.

#### **IV.5.1. MATERIAL Y MÉTODOS**

##### **IV.5.1.1. PATRONES**

Los patrones comerciales usados fueron los siguientes:

$\alpha$ -HCH, 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  en metanol (Supelco)

$\gamma$ -HCH, 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  en metanol (Supelco)

4,4'-DDT, 98,4 % sólido (Supelco)

Heptacloro, 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  en metanol (Supelco)

Mezcla de PBDEs, 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  total en isooctano (Dr. Ehrenstorfer)

BDE-47 (éter de 2,2',4,4'-tetrabromobifenilo), 42,5 %

BDE-99 (éter de 2,2',4,4',5-pentabromobifenilo), 10,9 %

BDE-100 (éter de 2,2',4,4',6-pentabromobifenilo), 39.3 %

Mezcla de PCBs, 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de cada congénere en isooctano (Supelco)

CB-10 (bifenilo 2,6-diclorado)

CB-28 (bifenilo 2,4,4'-triclorado)

CB-52 (bifenilo 2,2',5,5'-tetraclorado)

CB-138 (bifenilo 2,2',3,4,4',5'hexaclorado)

CB-153 (bifenilo 2,2',4,4',5,5'-hexaclorado)

CB-180 (bifenilo 2,2',3,4,4',5,5'-heptaclorado)

BB-15 (bifenilo 4,4'-dibromado), 99,8 % (Supelco)

BB-49 (bifenilo 2,2',4,5'-tetrabromado), 97 % (Dr. Ehrenstorfer)



Mezcla de PCBs marcados isotópicamente [<sup>13</sup>C], 5 µg.mL<sup>-1</sup> de cada congénere en nonano (Cambridge Isotope Laboratories): CB-28, CB-52, CB-101, CB-138, CB-153, CB-180 y CB-209.

A partir de los patrones comerciales se prepararon por pesada disoluciones de patrones individuales de 100 µg.mL<sup>-1</sup> de 4,4'-DDT en metanol y de BB-15 y BB-49 en n-hexano, y se guardaron a -20 °C.

A partir de las disoluciones stock se prepararon por pesada y dilución en hexano patrones mezcla de 10 µg.mL<sup>-1</sup> de las familias de OCPs, y PBBs.

A continuación, se prepararon patrones de trabajo mezcla desde 25 ng.mL<sup>-1</sup> a 400 ng.mL<sup>-1</sup> para cada compuesto, excepto para PBDEs desde 50 ng.mL<sup>-1</sup> a 800 ng.mL<sup>-1</sup> para la mezcla total.

Finalmente, se preparó una disolución de PCBs [<sup>13</sup>C] de 0,5 µg.mL<sup>-1</sup> en n-hexano, para su uso como patrón interno.

#### **IV.5.1.2. MUESTRAS**

Antes de su uso las muestras se trituraron y homogeneizaron. Las muestras de rodaballo y moluscos, además, fueron liofilizadas.

Para la optimización se prepararon dos lotes, de 100 g cada uno, de pienso de rodaballo adicionados con una concentración de cada compuesto de entre 5-20 ng.g<sup>-1</sup>. Para ello, se preparó una disolución de 200 mL de n-hexano con una concentración de cada compuesto entre 2,5-10 ng.mL<sup>-1</sup>. Esta disolución fue añadida a 100 g aproximadamente de pienso y se mezcló. Se dejó que el disolvente se evaporara a temperatura ambiente durante varios días, homogeneizando la mezcla periódicamente. Antes de

su uso, se estudió su homogeneidad, evaluando la reproducibilidad del análisis de cantidades de muestra entre 0,5 y 2 g.

Para la validación del método también se utilizó el material de referencia IAEA-406 con un contenido conocido de OCPs y PCBs. El material biológico de origen acuático (tejido de pez de granja) IAEA-406 (IAEA) posee un contenido certificado de compuestos orgánicos clorados (OCP y PCBs) entre 0,27 y 4,00 ng.g<sup>-1</sup>.

#### **IV.5.1.3. ADSORBENTES**

Se utilizaron como adsorbentes gel de sílice, florisil y alúmina. Para su activación se colocaron en la estufa a 105 °C durante 12 horas. El gel de sílice acidificado se preparó mezclando gel de sílice con ácido sulfúrico concentrado en proporción 60:40 en peso.

#### **IV.5.1.4. CONDICIONES INSTRUMENTALES DE MEDIDA**

Para la separación y determinación de los analitos se utilizó cromatografía de gases con dos técnicas de detección, la detección por captura electrónica, principalmente usada en la optimización de los métodos de extracción, y la espectrometría de masas, usada en la identificación y cuantificación de los analitos en las muestras.

##### **IV.5.1.4.1. Cromatografía de Gases con Detección por Captura Electrónica (GC-ECD)**

Para la separación y detección de los compuestos mediante GC-ECD se utilizó un cromatógrafo de gases HP 5890 Series II Plus con detector de captura electrónica (GC-ECD), equipado con un inyector automático HP

7673. La adquisición y procesado de datos se llevó a cabo con el software HP 9144 Chemstation.

La separación se realizó en una columna cromatográfica SPB 5 de 30 m de longitud x 0,32 mm diámetro interno (0,25  $\mu\text{m}$  de espesor de fase). Las condiciones experimentales de medida aparecen resumidas en la Tabla IV.5.1.

Tabla IV.5.1. Condiciones experimentales de medida del sistema GC-ECD.

Sistema cromatográfico (GC-ECD)	
Temperatura del inyector	250°C
Modo de Inyección	Splitless
Volumen de inyección	2 $\mu\text{L}$
Tiempo de purga	60 s
Relación de split	1:50
Flujo de gas portador de nitrógeno	1,7 mL/min <sup>-1</sup>
Programa de Temperaturas:	
Temp. Inicial (tiempo inicial)	70°C (2 min)
Rampa 1	20°C.min <sup>-1</sup>
Temp. Final 1 (tiempo final 1)	170°C (2 min)
Rampa 2	4°C.min <sup>-1</sup>
Temp. Final 2 (tiempo final 2)	250°C (0 min)
Rampa 3	10°C.min <sup>-1</sup>
Temp. Final 3 (tiempo final 3)	280°C (10 min)
Temperatura del detector	285°C
Presión de N <sub>2</sub> de make-up	20 psi

#### IV.5.1.4.2. Cromatografía de Gases acoplada con Espectrometría de Masas (GC-MS y GC-MS/MS)

Para la separación y detección de los compuestos mediante GC-MS se utilizó un cromatógrafo de gases Varian 3900 equipado con un detector de masas de trampa de iones 2100T y un inyector automático CP-8400, con

una columna HP-5ms con las mismas características que la anterior (30 m de longitud x 0,32 mm diámetro interno y 0,25 µm de espesor de fase). Para el control del equipo y tratamiento de los datos se utilizó el software Varian Saturn GC/MS Workstation v.5.52.

Tabla IV.5.2. Condiciones experimentales de medida del sistema GC-MS y MS/MS.

<b>Cromatógrafo de gases (GC)</b>		
Temperatura del inyector	250°C (o 274°C para SPME)	
Modo de Inyección	Splitless	
Volumen de inyección	2 µL	
Tiempo de purga	60 s	
Relación de split	1:50	
Flujo de gas portador de nitrógeno	1 mL/min <sup>-1</sup>	
Programa de Temperaturas:		
Temp. Inicial (tiempo inicial)	70°C (2 min)	
Rampa 1	20°C.min <sup>-1</sup>	
Temp. Final 1 (tiempo final 1)	170°C (2 min)	
Rampa 2	4°C.min <sup>-1</sup>	
Temp. Final 2 (tiempo final 2)	250°C (0 min)	
Rampa 3	10°C.min <sup>-1</sup>	
Temp. Final 3 (tiempo final 3)	280°C (10 min)	
<b>Espectrómetro de masas (MS)</b>		
	<b>MS</b>	<b>MS/MS</b>
Modo de ionización	Impacto electrónico (EI) 70 eV	
Corriente de emisión del filamento	20 µA	90 µA
Tiempo de delay	9,5 min	
Temperatura de la interfase	280°C	
Temperatura de la trampa de iones	250°C	
Temperatura del manifold	50°C	
Velocidad de escaneo	0,80 s/scan	
Offset del multiplicador	+ 100 v	
Target del AGC	20000 Cuentas	2000 Cuentas
Tipo de CID	resonante	

Tabla IV.5.3. Condiciones de mediada específicas para cada compuesto mediante GC-MS/MS.

Compuesto	TR (min)	Rango de m/z	Ion precursor (m/z)	iones de cuantificación (m/z)	Storage level de excitación (m/z)	Amplitud de excitación (V)
CB-10	9,70	110-240	222	152+187	110	1,40
$\alpha$ -HCH	10,89	100-240	219	181+183	120	1,30
$\gamma$ -HCH	11,89	100-240	219	181+183	120	1,30
CB-28	13,86	120-280	258	186+221	130	1,20
Heptacloro	14,38	110-300	272	235+237	140	1,70
CB-52	15,16	120-310	292	255+257	150	1,80
BB-15	16,30	140-320	312	152	140	2,80
CB-153	22,27	180-380	360	290+325	180	2,30
BB-49	23,10	100-480	470	389+391	220	1,80
4,4'-DDT	23,29	100-480	235	165	110	1,90
CB-138	23,44	100-480	360	290+325	180	2,30
CB-180	26,35	160-500	396	359+361	220	2,30
BDE-47	26,45	160-500	486	324+326+328	220	2,10
BDE-100	30,11	300-580	566	404+406	240	1,90
BDE-99	30,97	300-580	566	404+406	240	1,90
CB-28 C13	13,88	120-280	270	198+233	140	1,20
CB-52 C13	15,15	120-310	304	267+269	160	1,80
CB-101 C13	18,50	180-350	338	301+303	180	1,40
CB-153 C13	22,26	180-380	372	302+335+337	190	2,29
CB-138 C13	23,45	100-480	372	302+335+337	190	2,29
CB-180 C13	26,35	160-500	408	371+373	230	2,29

Las condiciones experimentales quedan recogidas en la tabla IV.5.2, en el caso de MS/MS, las específicas para cada compuesto aparecen en la tabla IV.5.3.

#### **IV.5.1.5. PREPARACIÓN DE MUESTRAS**

Se han evaluado 2 métodos de extracción de las muestras, extracción con fluido supercríticos (SFE) y dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD). Además, se utilizó la microextracción en fase sólida (SPME) para la preconcentración de los extractos.

Para la optimización de los métodos de preparación de muestra se utilizó el pienso con adición preparado según se describe en el apartado IV.5.1.2.

##### **IV.1.2.5.1. Extracción con Fluidos Supercríticos (SFE)**

La extracción de las muestras se realizó en un extractor de fluidos supercríticos Hewlett-Packard 7680A (Hewlett Packard), con una trampa empaquetada con octadecilsilano (ODS).

La celda de extracción de fluidos supercríticos, con un volumen de 7 mL, se llenó en modo sándwich, como se muestra en la figura IV.5.1, con 1 g de muestra, 1,5 g de alúmina básica y 1,5 g gel de sílice acidificado, desde el fondo a la parte superior, rellenando con papel de filtro el fondo y la parte superior de la celda, para evitar el posible volumen muerto y que pequeñas partículas de muestra y/o adsorbente alcancen el restrictor.

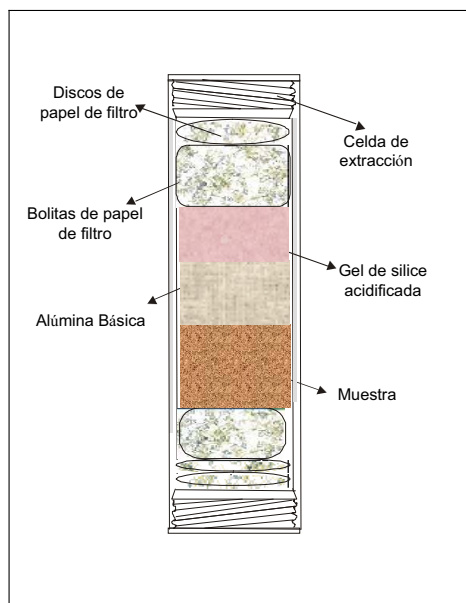


Figura IV.5.1. Esquema del llenado de una celda del SFE.

La extracción se realizó a 165 bar de presión y 60°C de temperatura con un flujo de CO<sub>2</sub> de 2 mL.min<sup>-1</sup> durante 5 minutos de extracción estática y 27 minutos de extracción dinámica. Los analitos quedaron retenidos en una trampa empaquetada de octadecilsilano (ODS) a 25°C y la elución se realizó con 2 mL de n-hexano.

El extracto se lleva a sequedad bajo corriente de nitrógeno y se reconstituye en 50 µL de n-hexano.

#### IV.5.1.5.2. Dispersión de la Matriz en Fase Sólida (MSPD)

En un mortero de vidrio se mezclan 1,5 g de la muestra con 1 g de C18, hasta conseguir una mezcla homogénea.

Para la extracción se utilizó una jeringa de plástico, que se rellenó en modo sándwich entre dos fritas, como se muestra en la figura IV.5.2, desde el fondo a la parte superior, con 2 g de gel de sílice acidificado, 1,5 g de

alúmina básica, y la mezcla de la muestra y C18 homogeneizada. La adición de la alúmina y gel de sílice acidificada permite la limpieza de la muestra durante la extracción.

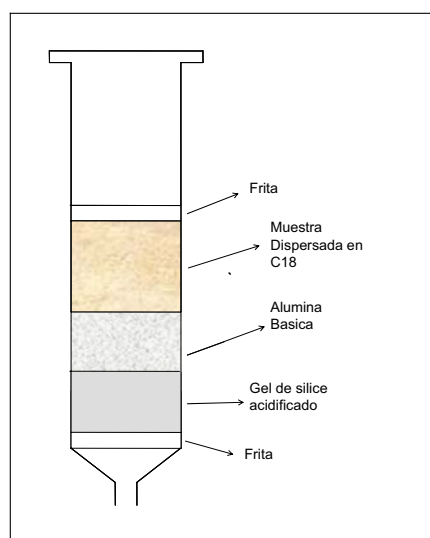


Figura IV.5.2. Esquema de la jeringa de MSPD.

A continuación, la columna se comprime a 8 mL y se realiza la elución con 30 mL de hexano. El extracto se concentra a 0,5 mL bajo corriente de nitrógeno en un Turbo-Vap II, y finalmente se lleva a sequedad. El residuo se reconstituye en 200  $\mu$ L de n-hexano.

#### **IV.5.1.5.3. Microextracción en Fase Sólida (SPME)**

Esta técnica se usó para la preconcentración de los analitos tras su extracción, y previamente a su introducción en el sistema cromatográfico. Por lo tanto, se aplicó a los extractos llevados a sequedad antes de su reconstitución en hexano.

La preconcentración se realizó con fibras de polidimetilsiloxano (PDMS) de 100  $\mu$ m de espesor de fase en un vial de 1,8 mL a 75°C durante



60 min. Posteriormente, los analitos se desorbieron en el inyector del sistema cromatográfico a 274°C durante 5 min.

## IV.5.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### IV.5.2.1. IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS

#### IV.5.2.1.1. Cromatografía de Gases con Detección de Captura Electrónica (GC-ECD)

Se determinó el tiempo de retención de los compuestos (tabla IV.5.4) inyectando patrones individuales o patrones de grupos de compuestos.

Tabla IV.5.4. Tiempos de retención de los compuestos estudiados mediante GC-ECD.

COMPUESTO	Tiempo de retención (min)
CB-10	9,71
$\alpha$ -HCH	10,72
$\gamma$ -HCH	11,63
CB-28	13,46
Heptacloro	13,88
CB-52	14,63
BB-15	15,80
CB-153	21,33
BB-49	22,05
CB-138	22,24
4,4'-DDT	22,41
CB-180 y BDE-47	25,22
BDE-100	28,87
BDE-99	29,87

En la figura IV.5.3 se presenta un cromatograma de un patrón de los compuestos de 50 ng.mL<sup>-1</sup>, obteniendo una buena separación

cromatográfica para todos los compuestos en 30 min, excepto para CB-180 y BDE-47, cuya separación no fue posible.

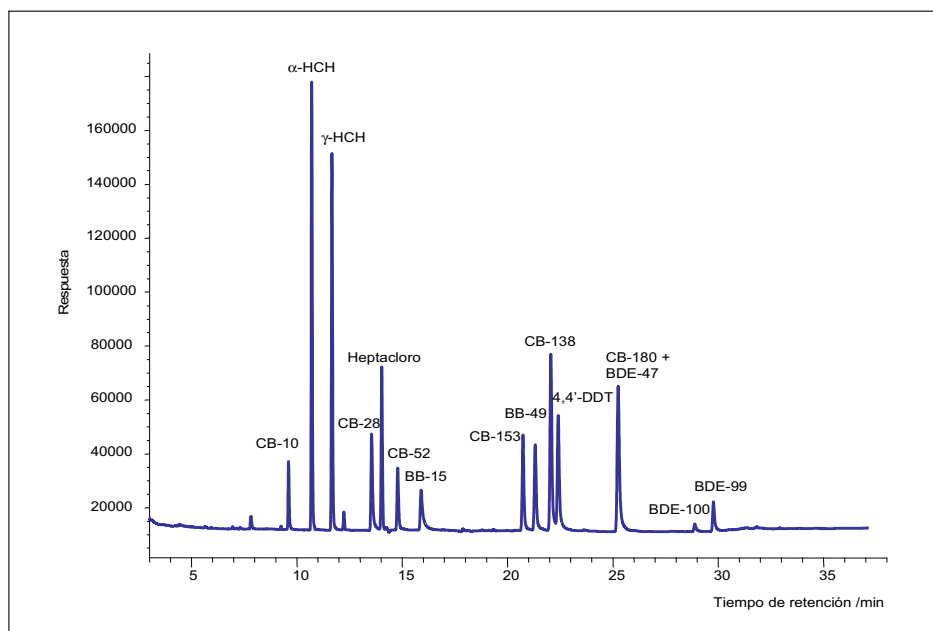


Figura IV.5.3. Cromatograma de GC-ECD para la determinación de especies halogenadas (50 ng.mL<sup>-1</sup>).

#### IV.5.2.1.2. Cromatografía de Gases -Espectrometría de Masas (GC-MS)

Se determinó el tiempo de retención de los compuestos (tabla IV.5.5) inyectando patrones individuales o patrones de grupos de compuestos.

Los iones de cuantificación seleccionados fueron los iones más intensos en el espectro de masas para cada compuesto, que se muestran en el anexo II.

Tabla IV.5.5. Tiempos de retención e iones de cuantificación de los compuestos estudiados mediante GC-MS.

Compuesto	TR	Iones de cuantificación
CB-10	10,022	222:224+152
$\alpha$ -BHC	11,177	181:183+219
$\gamma$ -BHC	12,249	181:183+219
CB-28	14,105	256:258
Heptacloro	14,639	100+272:274
CB-52	15,370	290:292
BB-15	16,708	152+312:314
CB-153	22,065	360:363
BB 49	23,177	391+470:472
4,4'-DDT	23,230	165+235:237
CB-138	23,268	360:363
CB-180	25,983	394:396
BDE-47	26,369	482:490
BDE-100	29,830	560:570
BDE-99	30,766	560:570
CB-28 C13	14,105	198+268+270
CB-52 C13	15,370	267+302+304
CB-101 C13	18,490	336+338+340
CB-153 C13	22,065	370+372+374
CB-138 C13	23,268	370+372+374
CB-180 C13	25,983	406+408+410

En la figura IV.5.4 se presenta un cromatograma de un patrón de los compuestos de 100 ng.mL<sup>-1</sup>, y se muestran el cromatograma de iones total y los cromatogramas de iones seleccionados según los iones de cuantificación de cada compuesto.

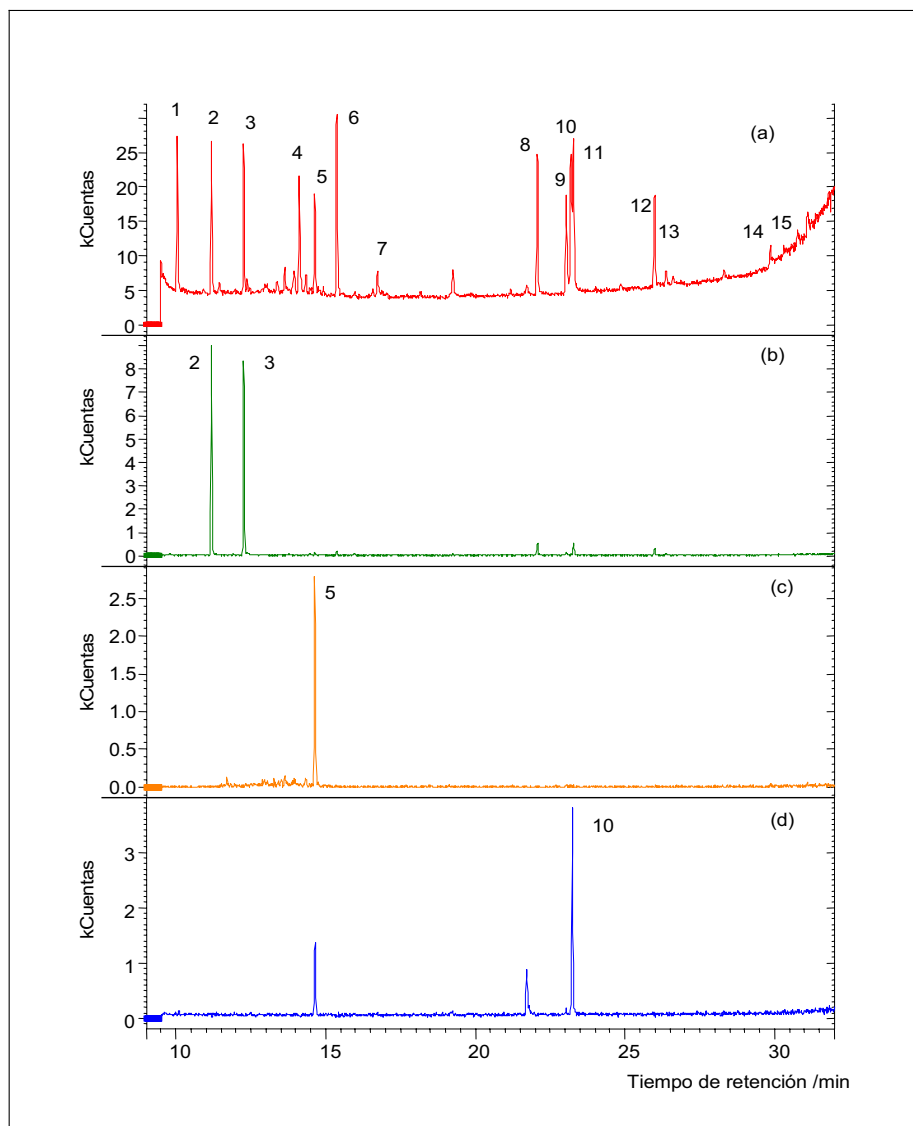


Figura IV.5.4. Cromatogramas de GC-MS para la determinación de especies halogenadas (100 ng.mL<sup>-1</sup>); (a) TIC; (b) m/z 181:183+219; (c) m/z 100+272:274; (d) m/z 165 +235:237; 1, CB-10; 2,  $\alpha$ -HCH; 3,  $\gamma$ -HCH; 4, CB-28; 5, Heptacloro; 6, CB-52; 7, BB-15; 8, CB-153; 9, BB-49; 10, 4,4'-DDT; 11, CB-138; 12, CB-180; 13, BDE-47; 14, BDE-100; 15, BDE-99 .

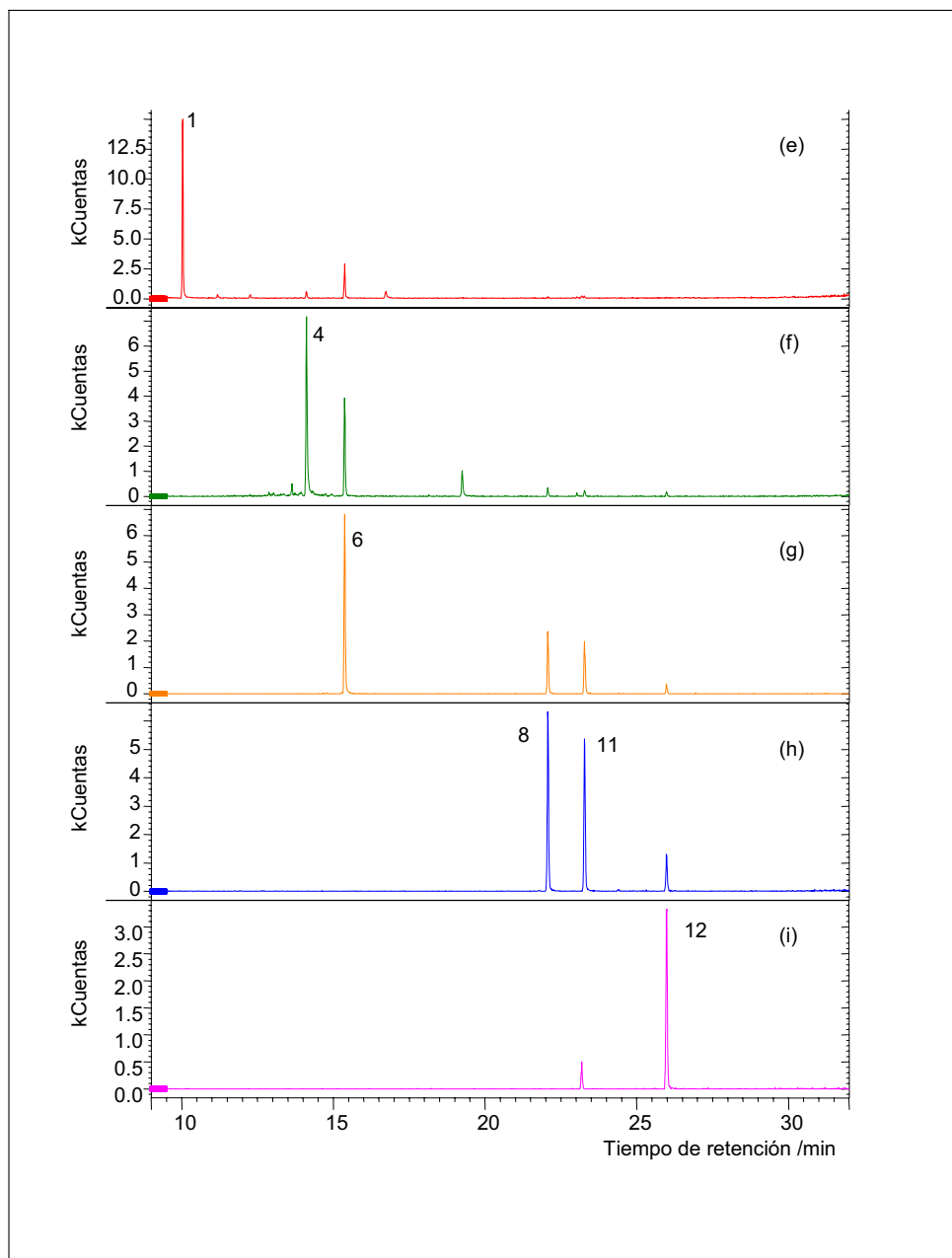


Figura IV.5.4. (Continuación) Cromatogramas de GC-MS para la determinación de especies halogenadas ( $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ); (e)  $m/z$  222:224+152; (f)  $m/z$  256:258; (g)  $m/z$  290:292; (h)  $m/z$  360:363; (i)  $m/z$  394:396; 1, CB-10; 2,  $\alpha$ -HCH; 3,  $\gamma$ -HCH; 4, CB-28; 5, Heptacloro; 6, CB-52; 7, BB-15; 8, CB-153; 9, BB-49; 10, 4,4'-DDT; 11, CB-138; 12, CB-180; 13, BDE-47; 14, BDE-100; 15, BDE-99 .

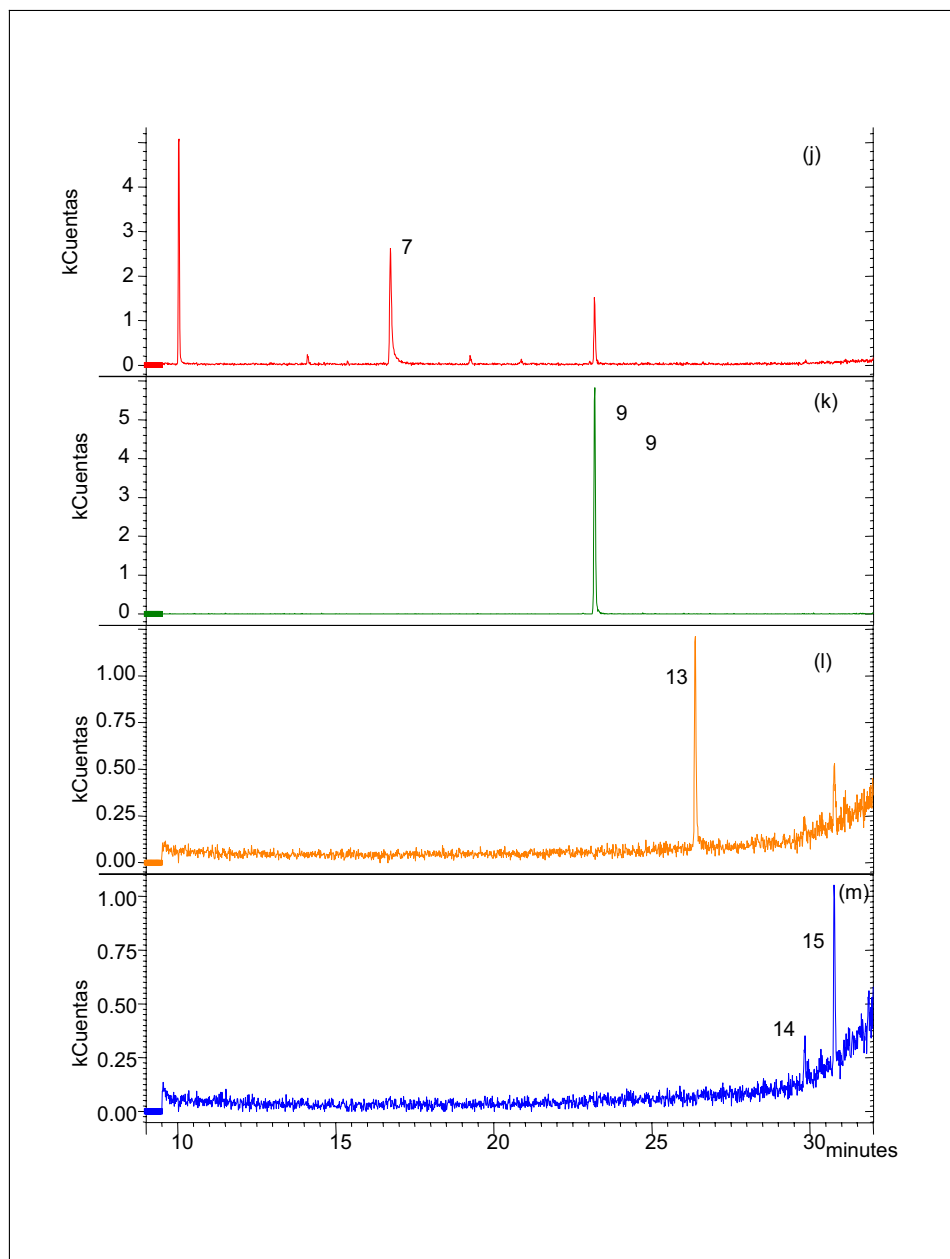


Figura IV.5.4. (Continuación) Cromatogramas de GC-MS para la determinación de especies halogenadas (100 ng.mL<sup>-1</sup>); (j) m/z 152+312:314; (k) m/z 391+470:472; (l) m/z 482:490; (m) m/z 560:570; 1, CB-10; 2,  $\alpha$ -HCH; 3,  $\gamma$ -HCH; 4, CB-28; 5, Heptacloro; 6, CB-52; 7, BB-15; 8, CB-153; 9, BB-49; 10, 4,4'-DDT; 11, CB-138; 12, CB-180; 13, BDE-47; 14, BDE-100; 15, BDE-99.

#### IV.5.2.1.3. Cromatografía de Gases -Espectrometría de Masas en tándem (GC-MS/MS)

Para el desarrollo del método de MS/MS se trataron de optimizar fundamentalmente, además de la selección del ión precursor, el *storage level* de excitación y la amplitud de excitación. El ion precursor se seleccionó a partir de los espectros de masas obtenidos para cada compuesto tras su inyección en modo MS por impacto electrónico (anexo II).

El *storage level* de excitación, que es dependiente de la masa del ion precursor, se seleccionó utilizando la calculadora “q” que posee el software, teniendo en cuenta que, como indica el manual del software utilizado<sup>7</sup>, este valor siempre tiene que encontrarse al menos dos unidades por debajo del ion producto de menor relación m/z.

La amplitud de excitación se seleccionó buscando obtener la menor señal del ion precursor y la mayor señal de los principales iones producto. La optimización se realizó mediante el desarrollo automatizado de métodos (AMD), que es otra herramienta que posee el software del equipo y que permite variar este parámetro hasta en 10 valores diferentes a lo largo del pico del compuesto de interés, por lo que se consigue una optimización más rápida.

La optimización se realizó en los modos resonante y no resonante, seleccionando finalmente para todos los compuestos el modo resonante, debido a que se obtenía una mayor respuesta.

Los parámetros optimizados y los tiempos de retención aparecen en la tabla IV.5.3.

Los espectros de MS/MS obtenidos para cada compuesto aparecen recogidos en el anexo II. La principal fragmentación observada para los compuestos estudiados es la pérdida de 1 o 2 átomos de halógeno,  $[M-X]^+$  o  $[M-2X]^+$ , como aparece ampliamente recogido en la bibliografía<sup>8,9,16</sup>.

En la figura IV.5.5 se presenta un cromatograma de un patrón de los compuestos de 50 ng.mL<sup>-1</sup>.

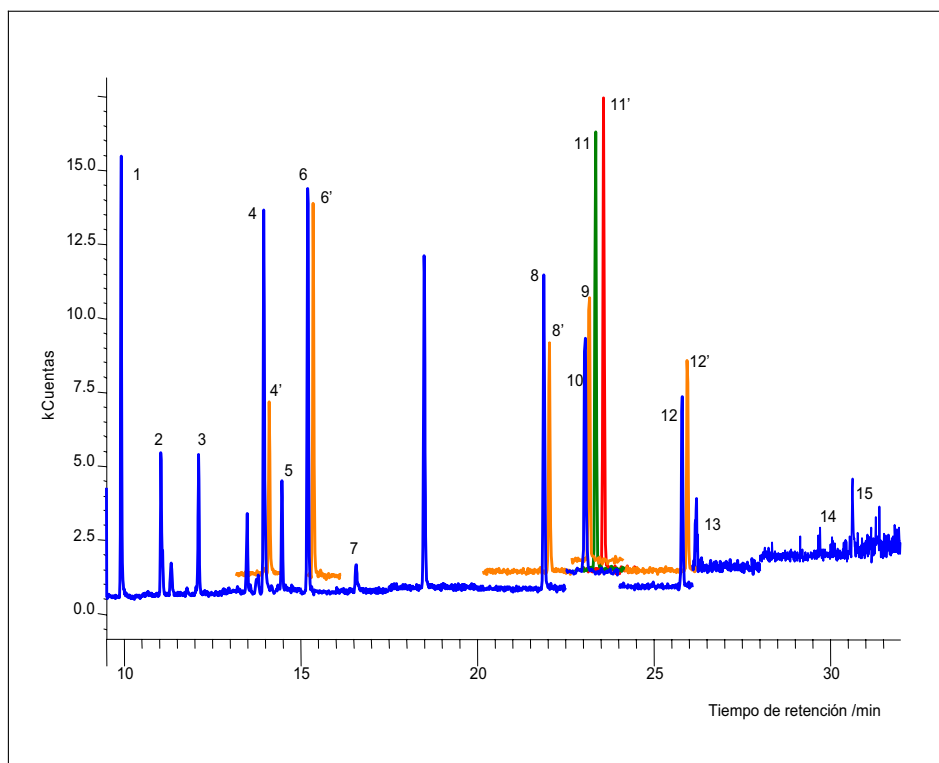


Figura IV.5.5. Cromatogramas de GC-MS/MS para la determinación de especies halogenadas (50 ng.mL<sup>-1</sup>); 1, CB-10; 2,  $\alpha$ -HCH; 3,  $\gamma$ -HCH; 4, CB-28; 5, Heptacloro; 6, CB-52; 7, BB-15; 8, CB-153; 9, BB-49; 10, 4,4'-DDT; 11, CB-138; 12, CB-180; 13, BDE-47; 14, BDE-100; 15, BDE-99, ' : indica los PCBs [<sup>13</sup>C] correspondientes.



## IV.5.2.2. VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS DE DETERMINACIÓN

Para la validación de los métodos de determinación se estudiaron parámetros como la linealidad, reproducibilidad y límites de detección. Los resultados se muestran en las tablas IV.5.6, IV.5.7 y IV.5.8 para GC-ECD, GC-MS y GC-MS/MS, respectivamente.

La linealidad se estudió para mezclas de patrones a 6 niveles de concentración en el rango de 10– 400 ng.mL<sup>-1</sup> para cada compuesto. Se obtuvieron coeficientes de correlación superiores a 0,994 para todos los compuestos, utilizando como patrón interno en la determinación mediante MS la mezcla de PCBs [13C].

El estudio de la precisión del método analítico se realizó evaluando la repetibilidad. Este valor se calculó para 5 inyecciones consecutivas de un patrón que contiene todas las especies en el nivel de 100 ng.mL<sup>-1</sup>, obteniendo una desviación estándar relativa (RSD) menor del 10 %.

Los límites de cuantificación obtenidos para una relación señal/ruido de 10, están en el rango de 1,84–6,55 ng.mL<sup>-1</sup> mediante GC-ECD, 0,2–1,3 ng.mL<sup>-1</sup> mediante GC-MS, y 0,05–2,3 ng.mL<sup>-1</sup> para GC-MS/MS.

Tabla IV.5.6. Parámetros del método de determinación de contaminantes halogenados mediante GC-ECD.

COMPUESTO	Linealidad/ r (a)	Repetibilidad/ RSD (%) <sup>(b)</sup>	LODs / ng.mL <sup>-1</sup> (c)	LOQs / ng.mL <sup>-1</sup> (d)
CB-10	0,9986	3,4	0,86	2,87
α-HCH	0,9996	7,0	0,83	2,76
γ-HCH	0,9996	7,9	1,02	3,40
CB-28	0,9989	5,4	0,70	2,35
Heptacloro	0,9997	7,9	1,78	5,95

Tabla IV.5.6. Parámetros del método de determinación de contaminantes halogenados mediante GC-ECD.

COMPUESTO	Linealidad/ r <sup>(a)</sup>	Repetibilidad/ RSD (%) <sup>(b)</sup>	LODs / ng.mL <sup>-1</sup> (c)	LOQs / ng.mL <sup>-1</sup> (d)
CB-52	0,9977	5,8	1,10	3,67
BB-15	0,9991	8,0	0,55	1,84
CB-153	0,9988	7,3	0,98	3,28
BB-49	0,9990	8,7	0,77	2,56
4,4'-DDT	0,9980	9,6	1,15	3,83
CB-138	0,9983	7,1	0,85	2,85
CB-180	0,9995	8,9	1,96	6,55
BDE-47				
BDE-100	0,9987	10,0	1,23	4,11
BDE-99	0,9988	9,5	1,09	3,62

(a) Calibración a 6 niveles (10–400 ng.mL<sup>-1</sup> para cada compuesto); (b) Patrón de 100 ng.mL<sup>-1</sup> (n=5); (c) definido para una relación señal/ruido de 3; (d) definido para una relación señal/ruido de 10.

Tabla IV.5.7. Parámetros del método de determinación de contaminantes halogenados mediante GC-MS.

COMPUESTO	Linealidad / r <sup>(a)</sup>	Repetibilidad/ RSD (%) <sup>(b)</sup>	LODs / ng.mL <sup>-1</sup> (c)	LOQs / ng.mL <sup>-1</sup> (d)
CB-10	0,9978	2,7	0,06	0,22
α-HCH	0,9970	1,2	0,08	0,28
γ-HCH	0,9972	2,2	0,09	0,31
CB-28	0,9954	6,5	0,18	0,59
Heptacloro	0,9940	1,9	0,18	0,59
CB-52	0,9972	1,6	0,04	0,14
BB-15	0,9967	6,3	0,23	0,78
CB-153	0,9993	2,7	0,09	0,29
BB-49	0,9991	2,7	0,19	0,66
4,4'-DDT	0,9973	8,5	0,18	0,60
CB-138	0,9990	3,3	0,07	0,23
CB-180	0,9972	4,6	0,06	0,20

Tabla IV.5.7. Parámetros del método de determinación de contaminantes halogenados mediante GC-MS.

COMPUESTO	Linealidad / r (a)	Repetibilidad/ RSD (%) <sup>(b)</sup>	LODs / ng.mL <sup>-1</sup> (c)	LOQs / ng.mL <sup>-1</sup> (d)
BDE-47	0,9947	6,8	0,23	0,76
BDE-100	0,9960	9,4	0,40	1,35
BDE-99	0,9969	6,7	0,38	1,27

(a) Calibración a 6 niveles (10-400 ng.mL<sup>-1</sup> para cada compuesto) utilizando como patrón interno los PCBs C13 (50 ng.mL<sup>-1</sup>); (b) Patrón de 100 ng.mL<sup>-1</sup> (n=5); (c) definido para una relación señal/ruido de 3; (d) definido para una relación señal/ruido de 10.

Tabla IV.5.8. Parámetros del método de determinación de contaminantes halogenados mediante GC-MS/MS.

COMPUESTO	Linealidad / r (a)	Repetibilidad/ RSD (%) <sup>(b)</sup>	LODs / ng.mL <sup>-1</sup> (c)	LOQs / ng.mL <sup>-1</sup> (d)
CB-10	0,9991	2,4	0,01	0,05
α-HCH	0,9984	2,6	0,07	0,22
γ-HCH	0,9990	2,5	0,09	0,30
CB-28	0,9993	1,5	0,12	0,41
Heptacloro	0,9967	1,4	0,19	0,64
CB-52	0,9976	3,0	0,03	0,09
BB-15	0,9948	2,8	0,25	0,83
CB-153	0,9983	1,7	0,07	0,25
BB-49	0,9947	7,1	0,13	0,42
4,4'-DDT	0,9954	5,4	0,23	0,77
CB-138	0,9977	2,5	0,03	0,10
CB-180	0,9966	4,9	0,12	0,39
BDE-47	0,9949	5,3	0,70	2,33
BDE-100	0,9946	9,2	0,23	0,75
BDE-99	0,9944	6,8	0,24	0,81

(a) Calibración a 6 niveles (10-400 ng.mL<sup>-1</sup> para cada compuesto) utilizando como patrón interno los PCBs C13 (50 ng.mL<sup>-1</sup>); (b) Patrón de 100 ng.mL<sup>-1</sup> (n=5); (c) definido para una relación señal/ruido de 3; (d) definido para una relación señal/ruido de 10.

Los parámetros analíticos muestran que con la espectrometría de masas en tándem se obtienen unos límites de detección menores que mediante GC-ECD. Además, la espectrometría de masas permite una identificación positiva de los compuestos mediante los espectros de masas.

#### **IV.5.2.3. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN/ LIMPIEZA MEDIANTE SFE**

Para la optimización de las condiciones de extracción y limpieza de los analitos se utilizó pienso con adición de los compuestos, preparado como se indica en el apartado IV.5.1.2, por lo que en primer lugar se estudió la homogeneidad del pienso. A continuación, se estudió la posibilidad de introducir adsorbentes en la celda de extracción para poder obtener un extracto limpio, principalmente exento de lípidos. Y, por último, se optimizaron las condiciones de la extracción con fluidos supercríticos mediante la utilización de diseños de experiencias.

Para todas las pruebas previas se trabajó en unas condiciones de SFE intermedias, 60°C a 210 bar, con un tiempo de extracción estática de 5 minutos y dinámica de 20 min, con trampa de ODS, a una temperatura de 25°C, y la elución se realizó con 2 mL de n-hexano.

##### **IV.5.2.3.1. Estudio de la homogeneidad del pienso con adición**

Para el estudio de la homogeneidad del pienso preparado con adición se tomaron diferentes masas de pienso entre 0,5 y 2 g y se extrajeron en el extractor de fluidos supercríticos. Los extractos se inyectaron en el GC-ECD, realizando cada experiencia por triplicado y

calculando el coeficiente de variación de las medidas en cuentas de área.

Como se observa para algunos compuestos representativos en la figura IV.5.6, se obtuvieron coeficientes de variación inferiores al 10% a partir de 1 g de muestra, valores similares a los obtenidos en los estudios de precisión del método GC-ECD.

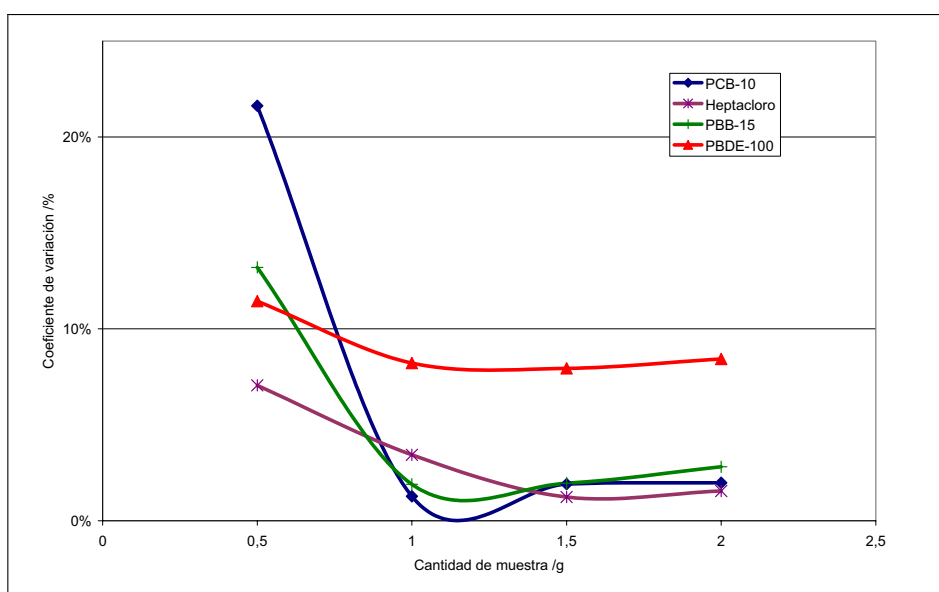


Figura IV.5.6. Estudio de la homogeneidad del pienso preparado con adición.

Por lo tanto, se tomó 1 g como tamaño mínimo de muestra del pienso preparado para la realización de los posteriores experimentos.

#### IV.5.2.3.2. Estudio de la limpieza

Se evaluó el comportamiento de diferentes adsorbentes para la limpieza de los extractos, florisil, alúmina básica, C18 y gel de sílice acidificada.

Se tomó 1 g de muestra y se realizaron extracciones mediante SFE con cantidades crecientes de cada adsorbente de 0–3 g. Y se calculó gravimetricamente la cantidad de grasa extraída llevando a sequedad los extractos.

Como puede observarse en la figura IV.5.7, tanto para el florisil, como para la alúmina básica y el gel de sílice acidificado es suficiente una cantidad de adsorbente de 1,5 g para obtener un porcentaje de residuo inferior al 0,1%. Por lo tanto, el estudio posterior se centró en estos tres adsorbentes, descartando el uso de C18.

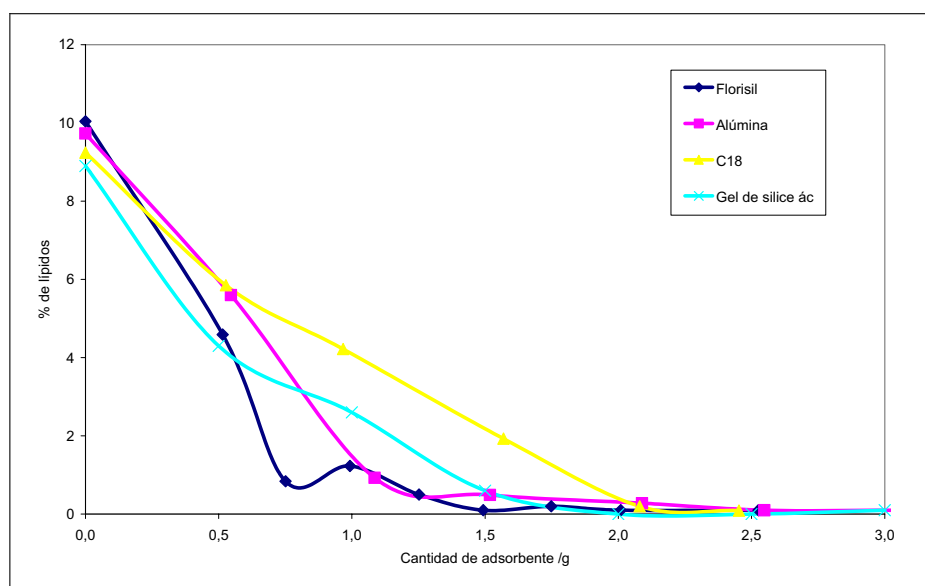


Figura IV.5.7. Estudio del % de grasa en el extracto usando diferentes adsorbentes.

Los extractos utilizados en el estudio gravimétrico, con menor cantidad de grasa, fueron reconstituidos en 100  $\mu$ L de n-hexano e inyectados en el sistema GC-ECD. A la vista de la figura IV.5.8, en la que se pueden comparar los cromatogramas utilizando cada uno de los

adsorbentes, se descartó el uso del florisil debido a las interferencias que aparecen al principio del cromatograma.

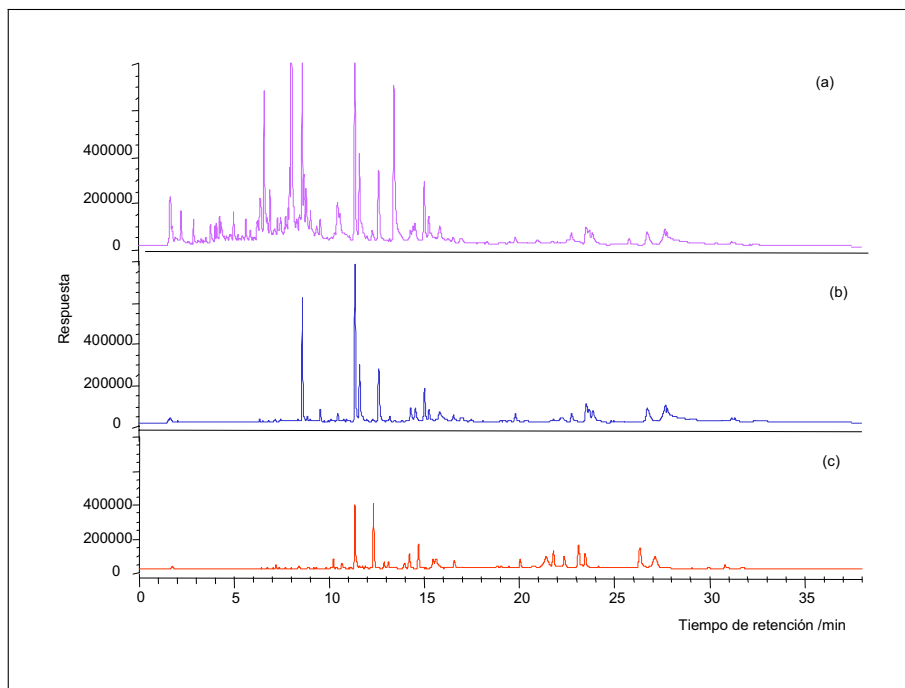


Figura IV.5.8. Estudio de la limpieza con diferentes adsorbentes (a) florisil; (b) alúmina básica; (c) gel de sílice acidificada.

Se estudió, por lo tanto, el uso de alúmina básica y gel de sílice acidificado, por separado y combinados estos adsorbentes en diferentes proporciones. Se obtuvieron los mejores resultados con el uso de una limpieza multifásica de alúmina básica y gel de sílice acidificado, 1,5 g de cada adsorbente. No es posible utilizar cantidades totales superiores a 3 g debido a la restricción de volumen de la celda de extracción del extractor de fluidos supercríticos.

#### **IV.5.2.3.3. Optimización de las condiciones de SFE**

Para la optimización de las condiciones de SFE se fijaron algunas condiciones basándose en la bibliografía<sup>10,11,12</sup> como el tipo de disolvente, n-hexano, y la temperatura de la trampa, 25°C.

El volumen de elución de la trampa se estudió realizando una extracción de pienso con adición y realizando la elución de la trampa con n-hexano en varias fracciones (5 x 1 mL), que fueron inyectadas en el sistema GC-ECD. Se observó que después de la elución con 2 mL de n-hexano los analitos han sido totalmente eluidos de la trampa, por lo tanto, se fija un volumen de elución de 2 mL.

La influencia de factores tales como la temperatura de extracción, presión de extracción, tiempo de extracción estática, tiempo de extracción dinámica y el flujo de CO<sub>2</sub> se estudiaron mediante un diseño de experiencias factorial fraccionado 2<sup>5-1</sup>, que implica un total de 16 experiencias. El diseño y tratamiento analítico del diseño experimental se realizó con el software Nemrod<sup>13</sup>.

La temperatura y la presión de extracción determinan la densidad del CO<sub>2</sub> y, por lo tanto, sus propiedades de difusión en la muestra, por lo que se tuvieron en cuenta estos dos factores en el diseño para evaluar una densidad de CO<sub>2</sub> entre 0,25 y 0,85 g.L<sup>-1</sup>. Para ello, los valores que se consideraron fueron una temperatura entre 60–120°C y una presión entre 140–320 bar. El tiempo de extracción estático se estudió en el rango 5–20 minutos, tiempo suficiente para un buen contacto entre los



compuestos y el agente extractor. El tiempo dinámico se estudió entre 10–60 min para arrastrar los analitos a la trampa. También se consideró el flujo de agente extractor en el rango 1–2,5 mL.min<sup>-1</sup>. El dominio experimental del interés se muestra en la tabla IV.5.9.

Tabla IV.5.9. Dominio experimental de los factores seleccionados en el diseño experimental 2<sup>5-1</sup> para la estudio de las condiciones de SFE.

Factor	Nivel Bajo (-1)	Nivel Alto (+1)	Unidades
Temperatura de extracción	60	120	°C
Presión	140	320	bar
Tiempo estática	5	20	min
Tiempo dinámica	10	60	min
Flujo de CO <sub>2</sub>	1	2,5	mL.min <sup>-1</sup>

Los experimentos se realizaron con el pienso con adición preparado, añadiendo, además, en la celda de extracción los adsorbentes seleccionados: alúmina básica y gel de sílice acidificado, siguiendo la matriz de experiencias aleatoria que se muestra en la tabla IV.5.10. Los extractos obtenidos se inyectaron en el sistema GC-ECD. Las respuestas registradas aparecen en la tabla IV.5.11.

Tabla IV.5.10. Matriz de experiencias del diseño 2<sup>5-1</sup>.

Matriz de experiencias aleatoria					
Nº Exp.	Temperatura extracción	Presión	Tiempo estática	Tiempo dinámica	Flujo CO <sub>2</sub>
1	60	140	5	10	2,5
2	120	140	5	10	1,0
3	60	320	5	10	1,0
4	120	320	5	10	2,5
5	60	140	20	10	1,0

Tabla IV.5.10. Matriz de experiencias del diseño  $2^{5-1}$ .

Matriz de experiencias aleatoria					
Nº Exp.	Temperatura extracción	Presión	Tiempo estática	Tiempo dinámica	Flujo CO <sub>2</sub>
6	120	140	20	10	2,5
7	60	320	20	10	2,5
8	120	320	20	10	1,0
9	60	140	5	60	1,0
10	120	140	5	60	2,5
11	60	320	5	60	2,5
12	120	320	5	60	1,0
13	60	140	20	60	2,5
14	120	140	20	60	1,0
15	60	320	20	60	1,0
16	120	320	20	60	2,5

Tabla IV.5.11. Respuestas obtenidas del diseño experimental  $2^{5-1}$ .

Nº Exp.	CB-10	$\alpha$ -HCH	$\gamma$ -HCH	CB-28	Heptacloro	CB-52	BB-15
1	125082	320284	142340	61979,5	166906	95610,1	45215,4
2	1861,6	4275,8	14744,8	30468,9	40417,2	26756,2	6170,5
3	103616	218923	253781	51609,6	365847	37167,3	79985,1
4	126073	213296	149921	57338,1	248295	73366,5	112044
5	121386	297860	255323	70100,2	266700	80967,6	73527,9
6	29872,6	4622,7	17589,7	26532,2	28033,7	22821,7	4816
7	77651,3	105204	95606,4	46599,2	126748	70644,5	43922,2
8	84314,4	33601	15083,2	51551,9	54791,7	59705,3	44441,8

Tabla IV.5.11. Respuestas obtenidas del diseño experimental 2<sup>5-1</sup>.

Nº Exp.	CB-10	α-HCH	γ-HCH	CB-28	Heptacloro	CB-52	BB-15
9	95761,7	230897	447753	77623,5	283050	77443,8	116603
10	106185	11334,9	41549,9	8224,2	66845,5	58181,2	4735,4
11	37166,7	70511	33256,2	41857,8	93249,2	67021,4	67746,8
12	83534	158329	152538	316926	237732	94711,1	257584
13	98344,3	303189	212945	44030	332759	43346	100895
14	67590,1	14173,6	24364,7	16070,4	31658,5	0	0
15	80576,1	260914	180106	103525	350736	160919	26467,4
16	83075	168739	135101	75567,4	271295	82894,2	274720

Tabla IV.5.11. Respuestas obtenidas del diseño experimental 2<sup>5-1</sup> (continuación).

Nº Exp.	CB-153	BB-49	CB-135	CB-180 y BDE-47	BDE-100	BDE-99
1	17236,6	32081,6	0	36022,9	0	0
2	14143,3	0	0	0	0	0
3	44833,8	110924	33518	23613	237986	47364,4
4	47317,4	37173,9	5516,6	564021,5	27999,5	0
5	14089	32285,2	6862,2	37829,1	0	0
6	0	0	0	5060,6	0	2129,6
7	5262,8	36056,1	25859,5	16664,9	10236,6	2267,3
8	13845,5	25696,1	0	34706	0	0
9	47794,8	63021,5	0	36535,7	142276	16529,9
10	14899,9	69468,2	0	22098,9	13559,8	8123,4
11	27159,9	105761	0	34550,9	47627,6	125657
12	47721,9	31326,5	9968,6	21010,8	204332	28422,7

Tabla IV.5.11. Respuestas obtenidas del diseño experimental 2<sup>5-1</sup> (continuación).

Nº Exp.	CB-153	BB-49	CB-135	CB-180 y BDE-47	BDE-100	BDE-99
13	46439,5	95387,5	56836,7	52147,2	216295	0
14	14724,2	0	0	0	0	0
15	39561,4	143910	32723,8	59140,4	150300	185499
16	62458	84673,6	0	52688,8	334405	21996,2

El tratamiento de los resultados de la tabla IV.5.11, como se muestra en la figura IV.5.9, reflejan que ni el tiempo de extracción estática, ni el flujo de CO<sub>2</sub> son estadísticamente significativos para ninguna de las respuestas. La pequeña influencia que tiene el tiempo de extracción estática es en todos los casos negativa y por ello se fija en el nivel bajo: 5 min. La influencia del flujo de CO<sub>2</sub> varía para cada compuesto pero en todos los casos su influencia es muy pequeña, por lo que se fija en un nivel intermedio 2 mL.min<sup>-1</sup>. La temperatura de extracción tiene una influencia negativa para casi todos los compuestos por lo que se fija en el nivel bajo (60°C).

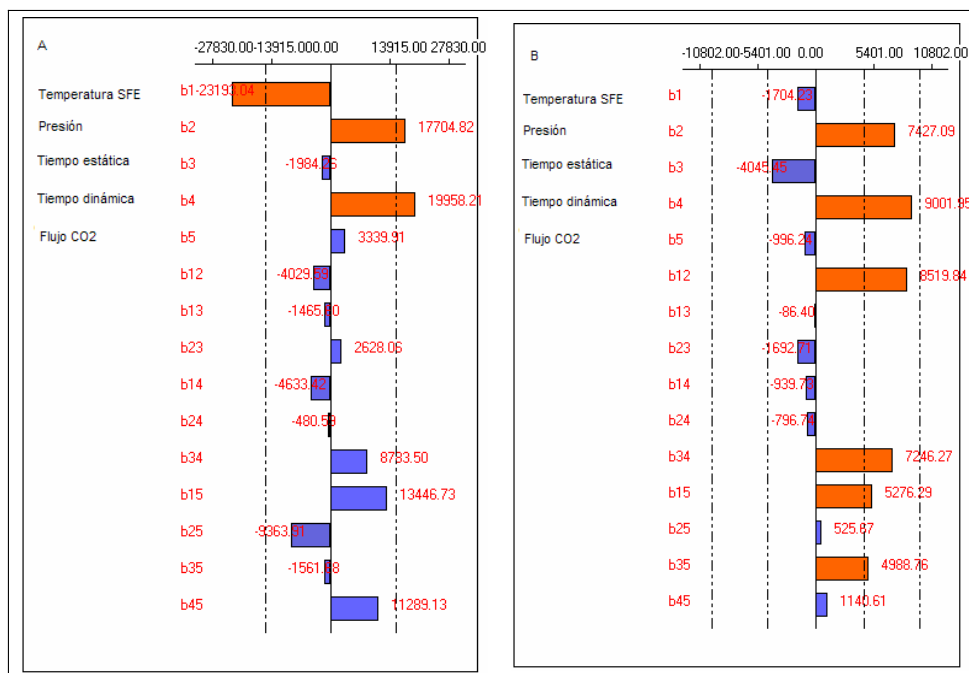


Figura IV.5.9. Gráfico Lenth de efectos principales e interacciones.; A: BB-49; B: 4,4'-DDT.

Los factores presión y tiempo de extracción tienen una influencia positiva en la extracción para la mayoría de los compuestos y en algunos casos son factores estadísticamente significativos. Se decidió estudiarlos mediante un diseño de superficie de respuesta para buscar un óptimo en unas condiciones intermedias que no requieran un tiempo de extracción dinámica de 60 min.

Para ello se aplicó un diseño Doehlert<sup>13</sup>, considerando los factores y niveles que aparecen en la tabla IV.5.12.

Tabla IV.5.12. Dominio experimental de los factores seleccionados en el diseño experimental Doehlert.

Factor	Centro	Paso	Unidades
Presión	210	110	bar
Tiempo dinámica	35	30	min

Las experiencias se hicieron, de igual manera que en el diseño factorial fraccional, siguiendo la matriz de la tabla IV.5.13.

Tabla IV.5.13. Matriz de experiencias del diseño Doehlert.

<b>Matriz de experiencias aleatoria</b>		
<b>Nº Exp.</b>	<b>Presión</b>	<b>Tiempo dinámica</b>
1	320	35
2	100	35
3	265	61
4	155	9
5	265	9
6	155	61
7	210	35
8	210	35
9	210	35
10	210	35

Se preparan las celdas con 1 g de pienso con adición, 1,5 g de alúmina básica y 1,5 g de gel de sílice acidificado. Se realizó la extracción en las condiciones indicadas por el número de experiencia. Los extractos se llevan a sequedad en corriente de nitrógeno, y posteriormente se reconstituyen en 100 µL de n-hexano para ser inyectados en el sistema GC-ECD. Los resultados se muestran en la tabla IV.5.14.

Tabla IV.5.14. Respuestas obtenidas con el diseño experimental Doehlert.

Nº Exp.	CB-10	$\alpha$ -HCH	$\gamma$ -HCH	CB-28	Heptacloro	CB-52	BB-15
1	93095,8	211698	237363	98634,7	239129	86702,4	103243
2	20504,1	6007,64	9757,82	21242,3	0	31228	13761,7
3	65630,8	216555	242364	102030	297670	93109,2	135512
4	31123,6	111764	55093,4	103557	86530	87379,5	106320
5	53398,1	172051	197185	92286,4	94118,9	84225,1	102002
6	108682	115317	258199	107601	160063	109525	113323
7	76682,5	211014	246472	106684	229416	104263	132636
8	96962,1	196583	230057	102886	190128	101730	110972
9	60462,6	190101	230652	98710,7	196636	101979	139877
10	108380	209254	229720	101151	178041	82767,1	119364

Tabla IV.5.14. Respuestas obtenidas del diseño experimental Doehlert (continuación).

Nº Exp.	CB-153	BB-49	CB-135	CB-180 y BDE-47	BDE-100	BDE-99
1	148534	137402	151358	243994	22317,1	51817,7
2	0	13792,4	0	0	0	8421,5
3	153376	134528	158890	262077	26831,4	52735,7
4	74492,3	40130,7	60899,9	0	0	15598,9
5	139775	119192	150276	207752	9618,42	23567,6
6	157448	149762	174967	274330	19638,4	44186,6
7	158288	148790	162971	284104	20143,9	53835
8	142404	134139	157129	245775	14099,9	54923,4
9	193525	165891	219224	298840	19148,5	53897,4
10	151322	151450	169089	253736	19241,5	54975,6

De las gráficas de las superficies de respuesta, obtenidas tras el tratamiento de los datos de la tabla IV.5.14 con el paquete estadístico Newrod<sup>13</sup>, se deduce que las condiciones ideales de extracción estarían en la zona media-alta para los valores de los dos factores objeto de estudio. En la figura IV.5.10 se muestran, a modo de ejemplo, las superficies de respuesta de  $\gamma$ -HCH y CB-52.

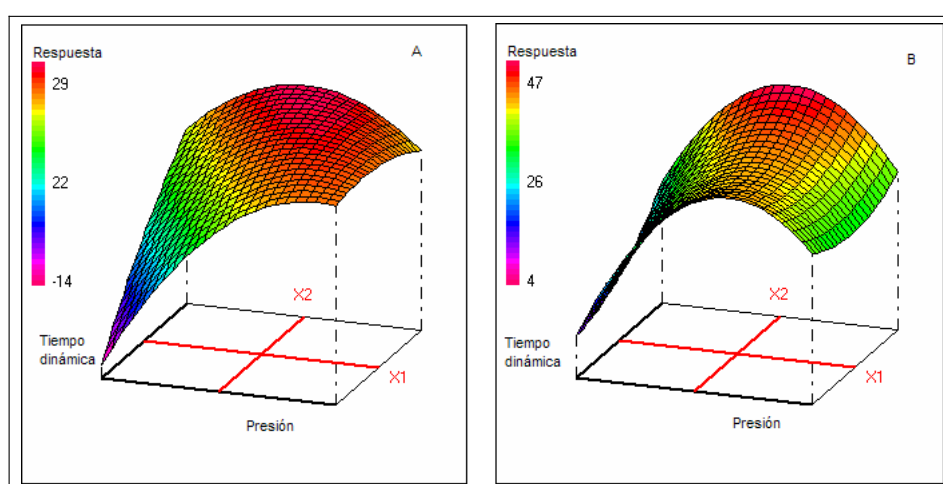


Figura IV.5.10. Superficie de respuesta del tiempo de extracción dinámica frente a la presión; A,  $\gamma$ -HCH; B, CB-52.

Los diferentes compuestos estudiados presentaron diferente comportamiento en la extracción al observar todas las superficies de respuesta obtenidas. Por ello, se consideró la posibilidad de buscar una solución de compromiso que satisfaga, lo mejor posible, el conjunto de los objetivos expresados. Mediante el uso de la función de deseabilidad, se busca la maximización de la respuesta (funciones individuales de deseabilidad unilaterales).

Considerando la función de deseabilidad global (figura IV.5.11) para todos los compuestos, se puede alcanzar el máximo de las



respuestas a una presión de 165 bar y un tiempo de extracción dinámica de 27 min. Las zonas sombreadas indican valores de deseabilidad global 0 y, por tanto, zonas no deseables de trabajo.

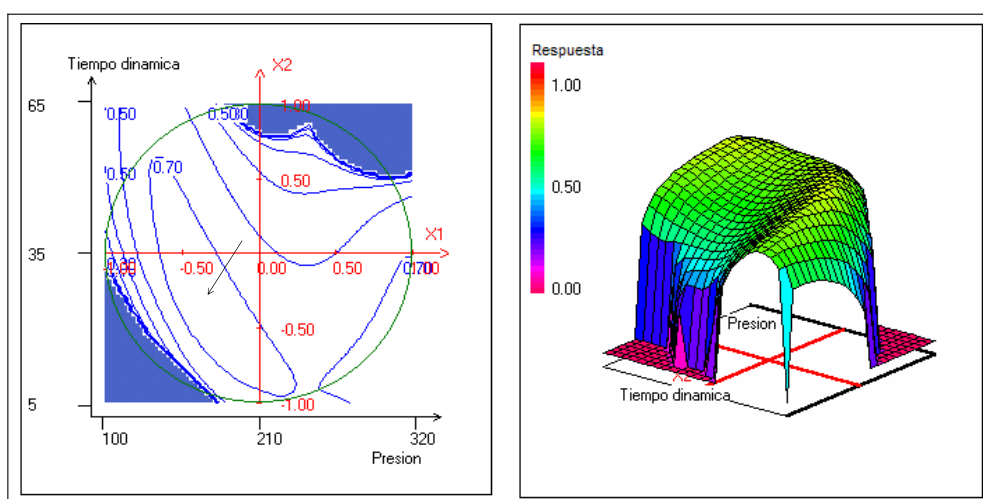


Figura IV.5.11. Funciones de deseabilidad global, gráfico bidimensional y tridimensional.

#### IV.5.2.4. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE MSPD

La optimización de la MSPD se llevó a cabo con el pienso con adición preparado según el apartado IV.5.1.2.

El tipo de adsorbente, la posibilidad de la elución bajo presión, la cantidad de C18 que se utiliza para la dispersión de la muestra y el volumen de n-hexano se estudiaron mediante un diseño híbrido<sup>14</sup> 2<sup>2</sup>3<sup>2</sup>, que supone 9 experiencias<sup>13</sup>.

Según las pruebas previas realizadas con adsorbentes (apartado IV.5.2.3.2) se decidió usar gel de sílice acidificado, ya que permitía obtener un extracto más limpio. Se estudió la combinación de gel de sílice con alúmina o con florisil. También se estudió la posibilidad de realizar la elución ejerciendo presión, bajando el émbolo 1 cm cada 5 min. Estos dos

factores se tuvieron en cuenta en el diseño como factores discontinuos con dos posibles niveles.

La cantidad de C18 se estudió entre 0,5 y 2 g y el volumen de disolvente entre 10–30 mL, considerándolos factores continuos con 3 posible niveles. Todo ello se muestra en la tabla IV.5.15 del dominio experimental de interés.

Tabla IV.5.15. Dominio experimental de los factores seleccionados en el diseño experimental  $2^23^2$ .

Factor	Nivel Bajo (-1)	Nivel intermedio (0)	Nivel Alto (+1)	Unidades
Tipo de elución	con presión		sin presión	
Adsorbente	Florisil		Alúmina	
Cantidad de C18	0,5	1	2	g
Volumen de hexano	10	20	30	mL

Tabla IV.5.16. Matriz de experiencias del diseño  $2^23^2$ .

Matriz de experiencias aleatoria				
Nº Exp.	Tipo de elución	Adsorbente	Cantidad C18	Volumen hexano
1	sin P	Alúmina	0,5	30
2	con P	Alúmina	2	10
3	sin P	Alúmina	1	20
4	sin P	Florisil	0,5	10
5	sin P	Florisil	2	30
6	sin P	Florisil	1	10
7	con P	Florisil	0,5	20
8	con P	Florisil	1	30
9	sin P	Florisil	2	20

Las experiencias se realizaron según la matriz de la tabla IV.5.16. Los extractos se llevaron a sequedad y se reconstituyeron en 200 µL de hexano para inyectarlos en el sistema GC-ECD. Los resultados aparecen en la tabla IV.5.17.

Tabla IV.5.17. Respuestas obtenidas del diseño experimental 2<sup>2</sup>3<sup>2</sup>.

Nº Exp.	CB-10	α-HCH	γ-HCH	CB-28	Heptacloro	CB-52	BB-15
1	83562	363360	520923	229092	373033	125599	55118
2	83628	363882	208743	241429	382798	140501	72155
3	121276	368450	549065	241861	387075	122098	70883
4	54211	415800	245056	192943	290284	94004	50037
5	103692	518208	519534	200347	328910	100029	49535
6	105750	635614	499418	198807	543443	116706	52341
7	81820	576313	545229	202382	344707	100253	29082
8	99760	673484	740598	194959	606528	120657	41483
9	96291	583860	555252	194280	513430	111309	67041

Tabla IV.5.17. Respuestas obtenidas del diseño experimental 2<sup>2</sup>3<sup>2</sup> (continuación).

Nº Exp.	CB-153	BB-49	CB-135	4,4'-DDT	CB-180 y BDE-47	BDE-100	BDE-99
1	412632	366977	186981	477898	883853	40410	117122
2	402685	378345	170939	430699	888910	33349	139592
3	407514	354824	177084	404014	795860	40875	112792
4	271922	251228	117161	304642	609236	25215	86935
5	341144	250340	124258	380375	671532	37229	107652
6	337435	285564	194816	353342	595997	34013	85950
7	344369	301280	157483	404855	716642	20922	119493

**CONTAMINANTES HALOGENADOS EN MUESTRAS DE ACUICULTURA**

Tabla IV.5.17. Respuestas obtenidas del diseño experimental 2<sup>2</sup>3<sup>2</sup> (continuación).

Nº Exp.	CB-153	BB-49	CB-135	4,4'-DDT	CB-180 y BDE-47	BDE-100	BDE-99
8	369129	319635	245550	369847	639829	33141	104354
9	261006	220250	164570	271596	388484	38832	71583

Del tratamiento de los datos con el paquete estadístico Nemrod<sup>13</sup> se observa que sólo resultan estadísticamente significativos la presión en la elución y el uso de alúmina como adsorbente para el BB-49. En general, se obtienen mejores resultados de extracción con presión, excepto para BB-15 y BDE-100, y el uso de alúmina como adsorbente, excepto para  $\alpha$ -HCH,  $\gamma$ -HCH y heptacloro. Para una buena extracción son necesarios al menos 1 g de C18 y 30 mL de hexano como disolvente de elución.

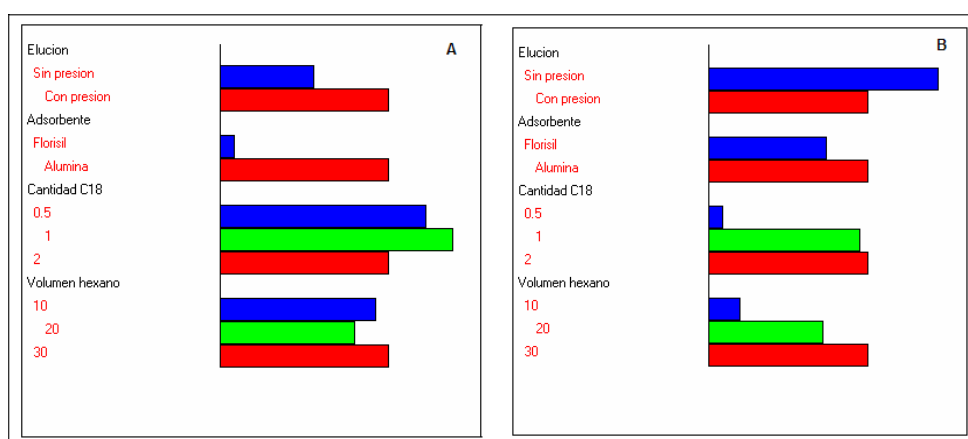


Figura IV.5.12. Gráfica de efectos totales; A, BB-49; B, BDE-100.

Las condiciones operacionales fijadas fueron: la elución con presión y con 30 mL de hexano, y el uso de 1 g de C18 para la dispersión.

La elección del adsorbente no resultaba totalmente clara ya que para la extracción de los plaguicidas ( $\alpha$ -HCH,  $\gamma$ -HCH y heptacloro) el florisil era el mejor adsorbente mientras para las demás familias de compuestos los resultados reflejaban que la alúmina era el mejor adsorbente. Por lo tanto, ,

a continuación, se decidió estudiar el adsorbente de manera univariante. Como se muestra en la figura IV.5.13 se obtuvieron valores de recuperación similares o mejores cuando se usó alúmina en todos los casos.

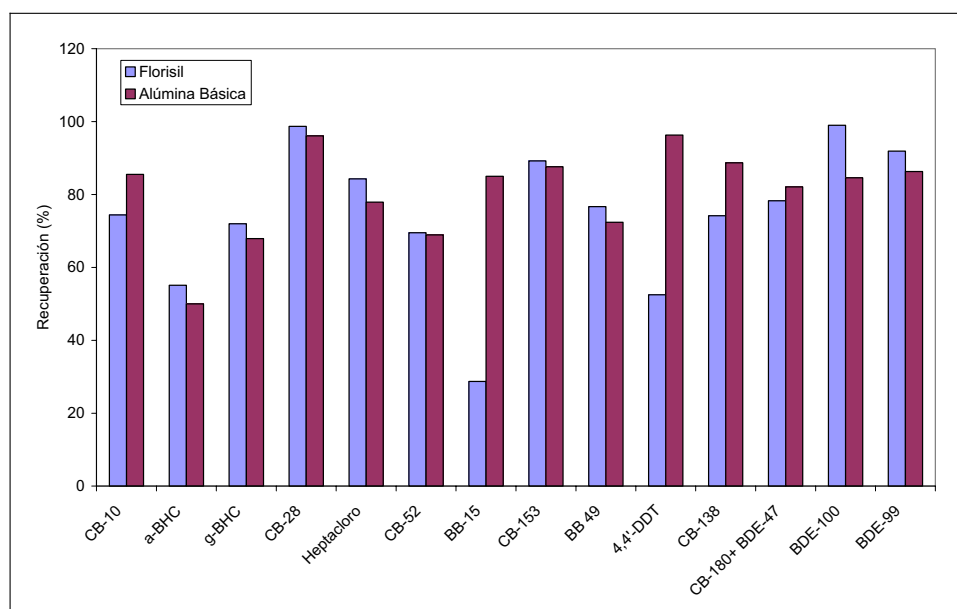


Figura IV.5.13. Estudio de la limpieza con diferentes adsorbentes.

#### IV.5.2.5. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE SPME

La optimización de la SPME se llevó a cabo con extractos de pienso con adición extraído mediante SFE, utilizando la fibra de PDMS<sup>15,16,17</sup>, previamente acondicionada a 250°C durante 30 min.

En primer lugar, se estudió el modo de muestreo, probando la extracción por inmersión o mediante espacio de cabeza. Para ello, los extractos se llevaron a sequedad y se reconstituyeron en agua con un 5% de metanol. Además se estudió una tercera posibilidad de realizar la SPME sobre el espacio de cabeza en un vial que contiene el extracto a sequedad sin reconstituir. Las pruebas realizadas en modo inmersión se llevaron a

cabo a temperatura ambiente, y las realizadas en modo espacio de cabeza se realizaron a elevada temperatura para favorecer el paso de los analitos desde la muestra al espacio de cabeza.

Como puede verse en la figura IV.5.14, las mayores respuestas se obtienen cuando la SPME se realiza en espacio de cabeza, especialmente cuando se aplica a los extractos a sequedad.

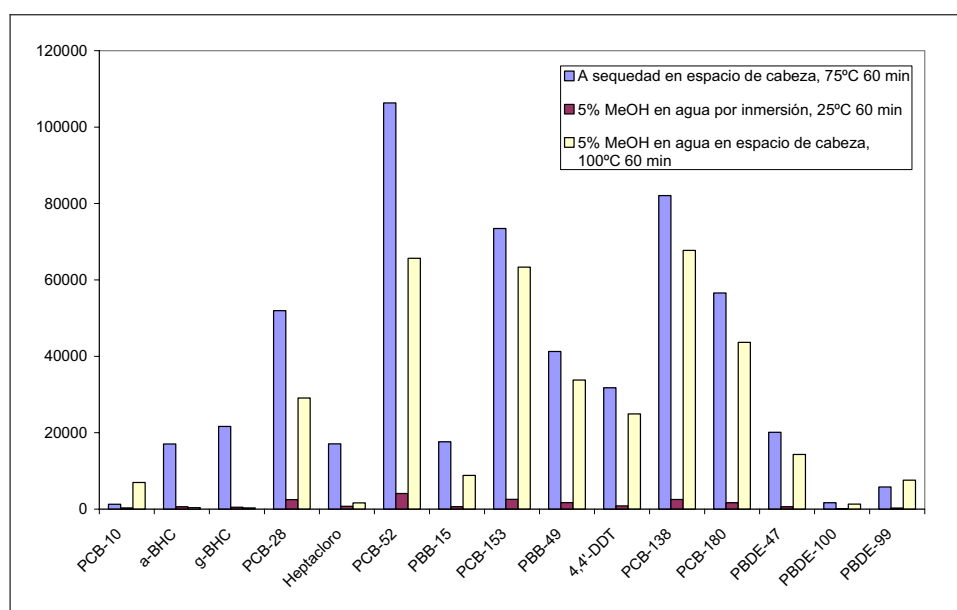


Figura IV.5.14. Estudio del modo de SPME.

Por lo tanto, se fijó el modo de extracción mediante espacio de cabeza sobre el extracto a sequedad sin reconstituir.

A continuación, se optimizaron las condiciones de extracción mediante SPME, el tiempo y la temperatura de extracción, y el tiempo y la temperatura de desorción.

Se estudió la temperatura y el tiempo de extracción de manera univariante. Se realizaron extracciones mediante SPME a temperatura ambiente (25°C) y a 75°C, temperatura máxima a la que se puede

introducir el soporte de la fibra en el horno, obteniendo respuestas mayores a 75°C. El tiempo de extracción se estudió entre 5 y 90 min, llegando al equilibrio para la mayoría de los compuestos a 60 min. A modo de ejemplo, en la figura IV.5.15, se muestran las cinéticas de SPME para 4,4'-DDT, CB-153 y BDE-47.

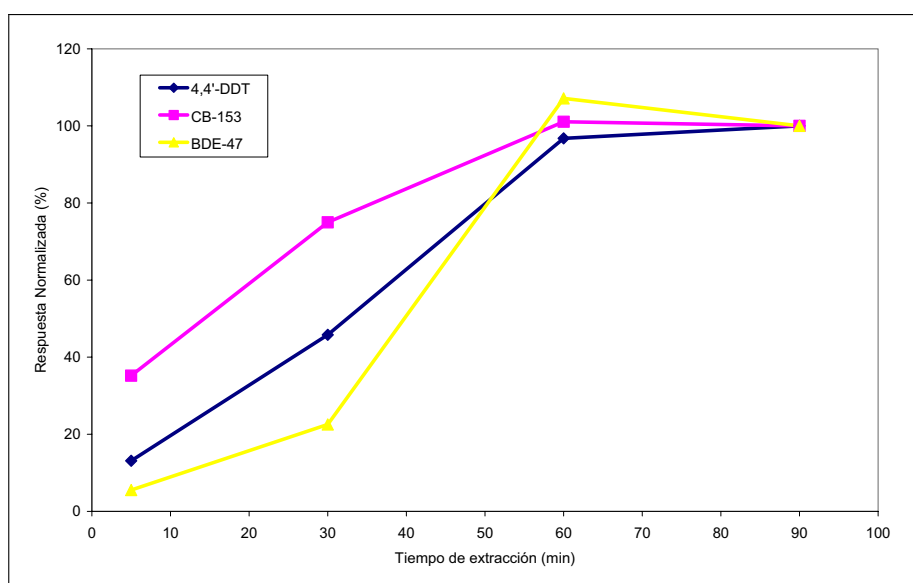


Figura IV.5.15. Estudio del tiempo de extracción de SPME a 75 °C.

Por lo tanto, las extracciones se realizaron a 75°C con un tiempo de exposición de 60 min.

El tiempo y la temperatura de desorción en el inyector del sistema GC se optimizaron utilizando un diseño experimental Doehlert<sup>13</sup>, mediante el paquete estadístico Nemrod<sup>13</sup>, considerando una temperatura de desorción entre 250–280 °C y un tiempo de desorción entre 1–11 min. El dominio experimental de interés se muestra en la tabla IV.5.18.

Tabla IV.5.18. Dominio experimental de los factores seleccionados en el diseño experimental Doehlert para la optimización de la SPME.

<b>Factores</b>	<b>Nivel bajo</b>	<b>Nivel alto</b>	<b>Unidades</b>
Tiempo desorción	1	11	min
Temperatura desorción	250	280	°C

Tabla IV.5.19. Matriz de experiencias del diseño Doehlert.

<b>Matriz de experiencias aleatoria</b>		
<b>Nº Exp.</b>	<b>Tiempo desorción</b>	<b>Temperatura desorción</b>
1	11	265
2	1	265
3	9	280
4	4	250
5	9	250
6	4	280
7	6	265
8	6	265
9	6	265

Las experiencias se realizaron con extractos de SFE a sequedad, realizando la extracción a 75°C durante 60 min, siguiendo la matriz de la tabla IV.5.19, y realizando la desorción en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases para realizar la determinación por GC-MS. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla IV.5.20.



Tabla IV.5.20. Respuestas obtenidas del diseño Doehlert para la optimización de la SPME.

Nº Exp.	CB-10	$\alpha$ -HCH	$\gamma$ -HCH	CB-28	Heptacloro	CB-52	BB-15
1	312227	118435	136184	431899	163601	630661	177748
2	276236	109772	133580	428926	185923	675209	164541
3	419408	143999	177907	509258	217784	826581	245275
4	417572	132620	149902	441031	170794	646979	158626
5	164273	94980	127792	363432	158068	581181	161200
6	221572	128559	165960	501872	200151	790855	219022
7	580682	196769	210586	610508	228692	906313	218279
8	402509	144449	159149	456875	184059	696421	170461
9	478562	152404	167266	517781	198552	759820	186080

Tabla IV.5.20. Respuestas obtenidas del diseño Doehlert para la optimización de la SPME (continuación).

Nº Exp.	CB-153	BB-49	CB-135	4,4'-DDT	CB-180	BDE-47	BDE-100	BDE-99
1	637197	605607	293226	716428	287735	167305	7851	19811
2	818930	765213	383424	953322	433252	251186	12282	25631
3	1029468	891502	405496	1224211	540910	345657	17230	62614
4	653803	483083	216577	684404	209059	88397	2359	7124
5	706972	768480	364675	858091	383490	227554	11752	27941
6	971016	1004923	426642	1086639	533069	377911	19086	64798
7	959304	677998	256040	1064304	378040	142182	5127	14241
8	768823	643521	290539	894101	312061	154347	6160	16509
9	763356	588462	275499	812240	269063	111639	3557	8793

Tras el tratamiento de los datos se observa que tanto la temperatura como el tiempo de desorción son factores estadísticamente significativos para el 4,4'-DDT, con una influencia positiva. Para los PBBs y PBDEs la temperatura es un factor estadísticamente significativo con una influencia también positiva. Para los demás compuestos ningún factor es estadísticamente significativo y presentan un comportamiento heterogéneo. En la figura IV.5.16, pueden observarse un ejemplo de las superficies de respuesta obtenidas para CB-10 y 4,4'-DDT.

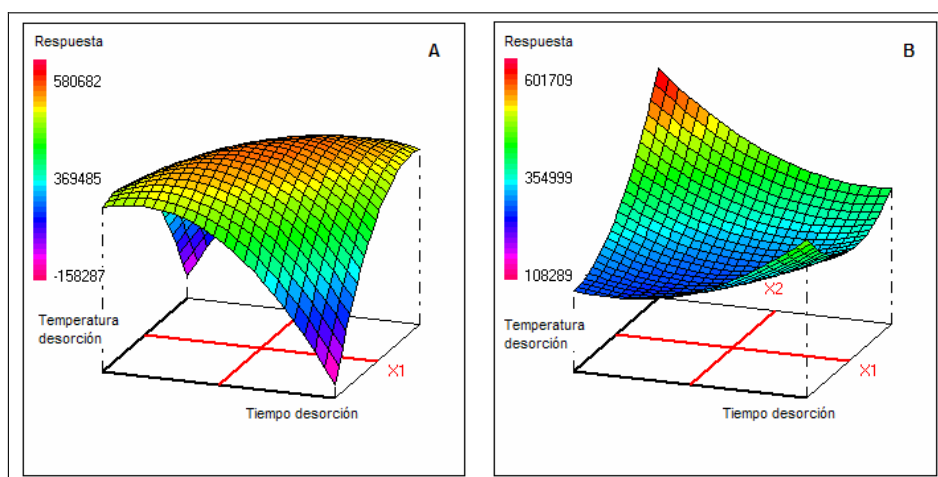


Figura IV.5.16. Gráfica de superficies de respuesta; A, CB-10; B, 4,4'-DDT.

Debido a la heterogeneidad de comportamientos es necesario buscar una solución de compromiso que permita satisfacer, lo mejor posible, el conjunto de los objetivos expresados. Para ello se hará uso, de nuevo, de la función de deseabilidad. Se busca la maximización de la respuesta a través de funciones de deseabilidad unilaterales por la izquierda.

Mediante el estudio de la función de deseabilidad global (figura IV.5.17), las coordenadas del óptimo de los factores estudiados en las

que se alcanzaba un mayor valor de  $d_i$  para todos los compuestos corresponden a un tiempo de desorción de 5 min y una temperatura de 274°C.

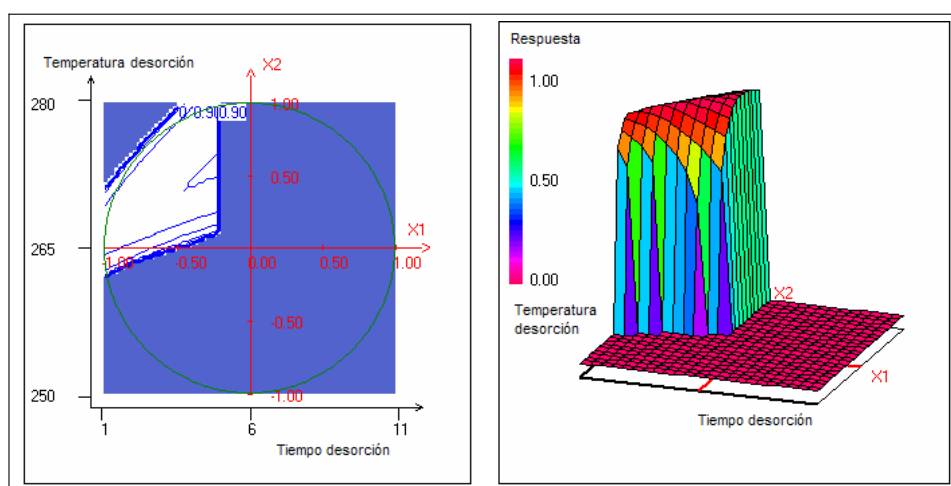


Figura IV.5.17. Funciones de deseabilidad global, gráfico bidimensional y tridimensional.

#### IV.5.2.6. VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS

En la validación de los diferentes métodos de extracción se estudió la recuperación, coeficiente de variación, y los límites de detección y cuantificación utilizando el sistema GC-MS/MS como técnica de determinación.

Para el cálculo de la recuperación y del coeficiente de variación se realizaron 6 extracciones de muestra de pienso con adición. La cuantificación para SFE y MSPD se realizó mediante calibración con patrón interno, utilizando los PCBs marcados isotópicamente [ $^{13}\text{C}$ ]. En el caso de SPME, debido al fuerte efecto matriz, la cuantificación se realizó mediante

adición estándar con patrón interno, utilizando los PCBs marcados isotópicamente [<sup>13</sup>C].

Para la SFE, como puede verse en la tabla IV.5.21, se obtuvieron recuperaciones entre 76–128%, con un coeficiente de variación menor de 15%. Los límites de detección, para una relación señal/ruido de 3, se obtuvieron en un intervalo entre 0,01–0,7 ng.g<sup>-1</sup>.

Tabla IV.5.21. Parámetros del método de extracción mediante SFE de contaminantes halogenados mediante GC-MS/MS.

COMPUESTO	Recuperación/ % (a)	Repetibilidad/ RSD (%) <sup>(b)</sup>	LODs / ng.g <sup>-1</sup> (c)	LOQs / ng.g <sup>-1</sup> (d)
CB-10	76	3	0,01	0,05
α-HCH	96	7	0,07	0,22
γ-HCH	80	11	0,09	0,30
CB-28	95	7	0,12	0,41
Heptacloro	78	10	0,19	0,64
CB-52	98	5	0,03	0,09
BB-15	89	9	0,25	0,83
CB-153	98	6	0,07	0,25
BB-49	106	7	0,13	0,43
4,4'-DDT	119	13	0,23	0,77
CB-138	100	5	0,03	0,10
CB-180	90	14	0,12	0,39
BDE-47	101	7	0,70	2,33
BDE-100	128	3	0,23	0,75
BDE-99	76	13	0,24	0,81

(a) Pienso con adición entre 10–20 ng.g<sup>-1</sup> (n=6); (b) Extracción del pienso con adición n=6 (c) definido para una relación señal/ruido de 3; (d) definido para una relación señal/ruido de 10.

Para la extracción mediante MSPD (tabla IV.5.22) se obtuvieron recuperaciones entre 50–96%, con un coeficiente de variación menor de

15%. Los límites de detección, para una relación señal/ruido de 3, se encontraron entre 0,02–0,9 ng.g<sup>-1</sup>.

Tabla IV.5.22. Parámetros del método de extracción mediante MSPD de contaminantes halogenados mediante GC-MS/MS.

COMPUESTO	Recuperación/ % (a)	Repetibilidad/ RSD (%) <sup>(b)</sup>	LODs / ng.g <sup>-1</sup> (c)	LOQs / ng.g <sup>-1</sup> (d)
CB-10	86	8	0,02	0,06
α-HCH	50	10	0,09	0,29
γ-HCH	68	10	0,12	0,40
CB-28	96	9	0,16	0,55
Heptacloro	78	9	0,25	0,85
CB-52	69	8	0,03	0,11
BB-15	85	11	0,33	1,11
CB-153	88	7	0,10	0,33
BB-49	72	9	0,17	0,57
4,4'-DDT	96	5	0,31	1,03
CB-138	89	7	0,04	0,14
CB-180	82	7	0,16	0,52
BDE-47	89	8	0,93	3,11
BDE-100	85	8	0,30	1,00
BDE-99	86	6	0,33	1,09

(a) Pienso con adición entre 10–20 ng.g<sup>-1</sup> (n=6); (b) Extracción del pienso con adición n=6 (c) definido para una relación señal/ruido de 3; (d) definido para una relación señal/ruido de 10.

La SPME se aplicó sobre los extractos secos de SFE, por lo tanto, para el método SFE-SPME (tabla IV.5.23) se obtuvieron recuperaciones entre 65–101%, con un coeficiente de variación menor de 16%. Mediante el uso de SFE-SPME se obtienen límites de detección muy bajos, menores de 9 pg.g<sup>-1</sup>,

necesarios para llevar a cabo la determinación de los analitos estudiados a niveles de ultratrazo.

Tabla IV.5.23. Parámetros del método de extracción mediante SFE-SPME de contaminantes halogenados mediante GC-MS/MS.

COMPUESTO	Recuperación/ % (a)	Repetibilidad/ RSD (%) <sup>(b)</sup>	LODs / pg.g <sup>-1</sup> (c)	LOQs / pg.g <sup>-1</sup> (d)
CB-10	78	11	0,3	1,0
$\alpha$ -HCH	86	9	0,7	2,5
$\gamma$ -HCH	89	12	1,2	4,0
CB-28	92	5	1,3	4,4
Heptacloro	65	7	1,8	6,0
CB-52	100	3	0,2	0,5
BB-15	77	10	2,1	6,9
CB-153	89	5	0,9	3,1
BB-49	99	11	1,2	3,9
4,4'-DDT	69	6	2,6	8,7
CB-138	77	7	0,5	1,7
CB-180	101	8	0,8	2,8
BDE-47	101	14	8,9	29,7
BDE-100	82	16	1,8	5,9
BDE-99	91	14	2,9	9,5

(a) Pienso con adición entre 10–20 ng.g<sup>-1</sup> (n=6); (b) Extracción del pienso con adición de 200 pg.g<sup>-1</sup> n=6 (c) definido para una relación señal/ruido de 3; (d) definido para una relación señal/ruido de 10.

Por lo tanto, los tres procedimientos de extracción utilizados presentan unos valores de recuperación y repetibilidad satisfactorios. Los límites de detección mediante SFE y MSPD son adecuados para el análisis de estos compuestos en muestras medioambientales y en productos para la

alimentación animal y humana. El uso de SFE-SPME permite, además, el análisis de los contaminantes halogenados a niveles ultratrazo.

La exactitud y precisión del método se evaluó mediante el análisis del material de referencia IAEA-406. Los resultados pueden verse en la tabla IV.5.24 y están en concordancia con los valores de referencia. Todos los resultados se encuentran en el intervalo del material del IAEA, a pesar de que la homogeneidad del material sólo está garantizada para tamaños de muestra mayores de 5 g y la cantidad máxima utilizada en estos métodos es de 1,5 g, debido a las limitaciones de capacidad de las configuraciones utilizadas.

Tabla IV.5.24. Análisis del material de referencia IAEA-406 (n=6).

COMPUESTO	Valor certificado IAEA-406 (ng.g <sup>-1</sup> )	Intervalo de confianza certificado (ng.g <sup>-1</sup> )	SFE-GC-MS/MS (ng.g <sup>-1</sup> )(a)	SFE-SPME-GC-MS/MS (ng.g <sup>-1</sup> )(a)	MSPD-GC-MS/MS (ng.g <sup>-1</sup> ) (a)
CB-10	-	-	-	-	-
α-HCH	0,79	0,23 - 1,7	0,25 ± 0,04	0,26 ± 0,02	0,28 ± 0,03
γ-HCH	0,27	0,11 - 0,80	0,78 ± 0,02	0,77 ± 0,1	0,72 ± 0,09
CB-28	0,57	0,43 - 1,3	1,26 ± 0,3	0,56 ± 0,04	1,06 ± 0,06
Heptacloro	0,32	0,23 - 0,46	n.d.	0,37 ± 0,03	n.d.
CB-52	1,30	1,0 - 2,2	2,14 ± 0,2	1,16 ± 0,2	1,53 ± 0,05
BB-15	-	-	-	-	-
CB-153	3,70	2,9 - 6,0	4,65 ± 0,3	3,11 ± 0,3	3,71 ± 0,18
BB-49	-	-	-	-	-
4,4'-DDT	3,00	1,8 - 5,6	3,16 ± 0,5	3,36 ± 0,4	2,22 ± 0,09
CB-138	4,00	2,5 - 6,3	3,04 ± 0,6	3,24 ± 0,2	3,34 ± 0,10
CB-180	1,20	1,0 - 1,2	1,33 ± 0,2	1,06 ± 0,1	1,16 ± 0,14

Tabla IV.5.24. Análisis del material de referencia IAEA-406 (n=6).

COMPUESTO	Valor certificado IAEA-406 (ng.g <sup>-1</sup> )	Intervalo de confianza certificado (ng.g <sup>-1</sup> )	SFE-GC-MS/MS (ng.g <sup>-1</sup> )(a)	SFE-SPME-GC-MS/MS (ng.g <sup>-1</sup> )(a)	MSPD-GC-MS/MS (ng.g <sup>-1</sup> ) (a)
BDE-47	-	-	-	-	-
BDE-100	-	-	-	-	-
BDE-99	-	-	-	-	-

(a) valor medio ± desviación estándar. n.d.: no detectado, se encuentra por debajo del límite de cuantificación del método.

#### IV.5.2.7. APLICACIÓN A MUESTRAS REALES

Los métodos de extracción se aplicaron al análisis de varias muestras reales incluyendo piensos de pescado de acuicultura y especies cultivadas en granjas marinas como rodaballo, almeja, berberecho y mejillón.

Los resultados se muestran en las tablas IV.5.25, IV.5.26 y IV.5.27. Como se muestra, los piensos de trucha fueron analizados mediante los tres procedimientos de preparación de muestra, y el pienso de rodaballo fue analizado mediante MSPD y SFE-SPME. Las muestras de moluscos analizadas por cada uno de los procedimientos de preparación de muestra fueron diferentes.



Tabla IV.5.25. Análisis de muestras reales mediante SFE y GC-MS/MS en ng.g<sup>-1</sup> (n=3).

COMPUESTO	Pienso trucha 1	Pienso trucha 2	Berberecho 1	Almeja 1	Mejillón 1
CB-10	n.d.	n.d.	0,2	0,5	0,4
α-HCH	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
γ-HCH	n.d.	n.d.	n.d.	23,6	32,7
CB-28	n.d.	2,2	n.d.	10,4	9,5
Heptacloro	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CB-52	1,7	2,4	16,0	28,7	40,5
BB-15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CB-153	7,2	4,4	9,9	20,7	45,9
BB-49	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4,4'-DDT	n.d.	n.d.	5,4	117,8	10,8
CB-138	5,3	4,4	5,1	13,2	25,2
CB-180	1,7	1,0	2,8	3,1	2,8
BDE-47	n.d.	n.d.	n.d.	2,4	n.d.
BDE-100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
BDE-99	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d.: no detectado.

**CONTAMINANTES HALOGENADOS EN MUESTRAS DE ACUICULTURA**

Tabla IV.5.26. Análisis de muestras reales mediante MSPD y GC-MS/MS en ng.g<sup>-1</sup> (n=3).

COMPUESTO	Pienso trucha 1	Pienso trucha 2	Pienso Rodaballo	Berberecho 2	Almeja 2	Mejillón 2
CB-10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,2	0,1
α-HCH	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
γ-HCH	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5,2	9,4
CB-28	n.d.	1,0	n.d.	n.d.	3,8	2,6
Heptacloro	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CB-52	0,2	0,6	n.d.	5,1	11,4	16,2
BB-15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CB-153	5,1	3,1	1,2	4,2	10,9	22,3
BB-49	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4,4'-DDT	n.d.	n.d.	0,9	3,7	166,6	28,6
CB-138	3,1	2,5	1,0	2,4	7,3	13,5
CB-180	1,6	1,1	0,4	0,6	1,5	1,1
BDE-47	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
BDE-100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
BDE-99	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d.: no detectado.

Tabla IV.5.27. Análisis de muestras reales mediante SFE-SPME y GC-MS/MS en ng.g<sup>-1</sup>.

COMPUESTO	Pienso trucha 1	Pienso trucha 2	Pienso Rodaballo	Rodaballo	Berberecho 3	Almeja 3	Mejillón 3
CB-10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,2	0,4	0,3
α-HCH	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
γ-HCH	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,5	15,9
CB-28	0,2	1,1	0,03	0,5	n.d.	4,7	5,1
Heptacloro	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CB-52	0,3	0,8	0,2	0,7	n.d.	16,3	13,2
BB-15	n.d.	n.d.	n.d.	0,04	0,2	n.d.	n.d.
CB-153	5,7	2,8	1,4	1,5	4,1	13,4	33,2
BB-49	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4,4'-DDT	0,3	1,0	0,8	0,4	4,9	4,5	8,8
CB-138	3,5	1,5	1,2	0,9	6,9	2,2	9,4
CB-180	1,8	0,9	0,4	0,2	3,4	2,1	1,3
BDE-47	n.d.	1,2	0,5	1,1	n.d.	1,7	1,0
BDE-100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
BDE-99	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d.: no detectado.

Los compuestos encontrados principalmente en las muestras son las diferentes formas de PCBs y el 4,4'-DDT, que son los compuestos más estudiados en el medioambiente debido a su elevada bioacumulación en los medios biológicos. En las muestras de almeja y en las de mejillón se encontró también el γ-HCH, y en la muestra de rodaballo y en las de berberecho el BB-15, pero a niveles muy bajos. El único PBDE que se

encontró en las muestras fue el BDE-47 a niveles considerables en muestras de almeja y mejillón.

En los piensos para peces los niveles de plaguicidas obtenidos son inferiores a los niveles legislados por la Unión Europea en productos destinados a la alimentación animal<sup>5</sup>. Los niveles encontrados de 4,4'-DDT se encuentran entre 0,3-1 ng.g<sup>-1</sup>, siendo el límite máximo de la legislación de 50 ng.g<sup>-1</sup>.

La legislación Europea no fija límites máximos de PBBs, PBDEs y PCBs en productos para la alimentación animal, solamente existen límites para PCBs similares a las dioxinas<sup>5</sup>, que no son objeto de estudio en este trabajo. Los niveles de concentración encontrados en piensos para estas familias de compuestos (PCBs: 2,6-15 ng.g<sup>-1</sup>; PBDEs: 0,5-1,2 ng.g<sup>-1</sup>) son similares o inferiores a los que aparecen en la bibliografía<sup>18,19</sup> (PCBs: 22,8-346 ng.g<sup>-1</sup>; PBDEs: 0,3-7,2 ng.g<sup>-1</sup>).

En las muestras analizadas en este trabajo (peces y moluscos procedentes de Galicia) se obtuvieron concentraciones, en el rango 3,8-124 ng.g<sup>-1</sup> para PCBs totales y 1,0-2,4 ng.g<sup>-1</sup> para PBDEs totales. Estos valores son similares a los encontrados en peces de Europa<sup>18,19</sup>, 3,4-93 ng.g<sup>-1</sup> para PCBs y 0,08-18,8 ng.g<sup>-1</sup> para PBDEs. En todos los casos los congéneres más abundantes fueron CB-153 (entre los PCBs) y BDE-47 (entre los PBDEs), al igual que en la bibliografía.

El nivel de concentración de plaguicidas organoclorados encontrados en los peces y moluscos (4,4'-DDT: 0,4-166 ng.g<sup>-1</sup>;  $\gamma$ -HCH: 3,5-32,7 ng.g<sup>-1</sup>) es ligeramente superior a los niveles encontrados en la bibliografía<sup>18,20</sup>

en muestras de peces en Europa (4,4'-DDT: 0,75–37,5 ng.g<sup>-1</sup>;  $\gamma$ -HCH: 2–7,11 ng.g<sup>-1</sup>).

En las figuras IV.5.18 y IV.5.19, pueden verse dos cromatogramas de GC-MS/MS de dos muestras, una muestra de berberecho extraída mediante MSPD y una muestra de almeja extraída mediante SFE-SPME, respectivamente.

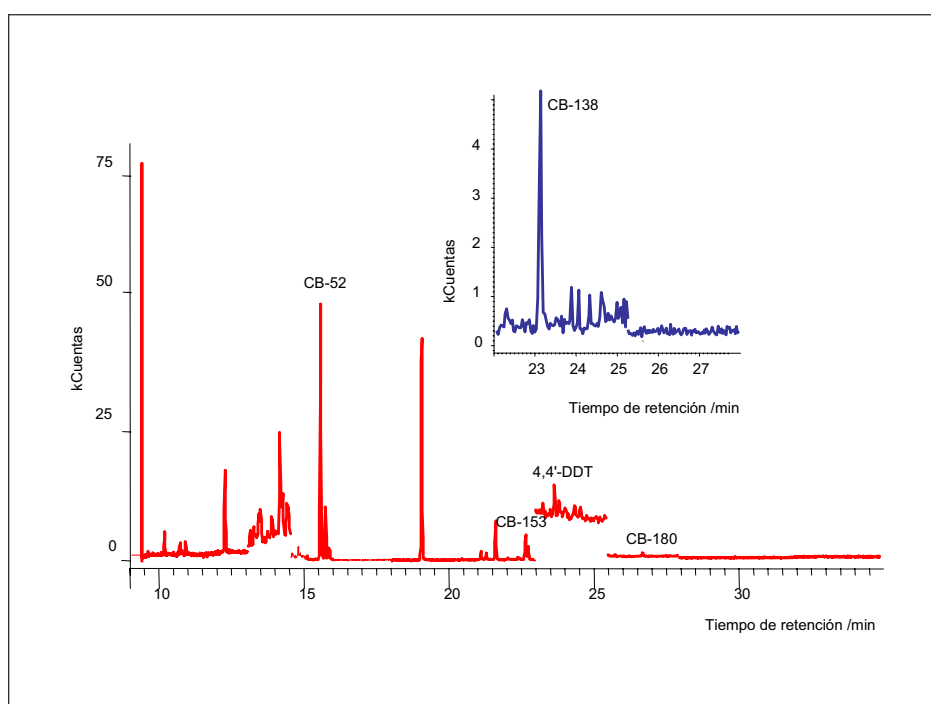


Figura IV.5.18. Cromatograma de un extracto de una muestra de berberecho obtenido mediante GC-MS/MS, extraída mediante MSPD.

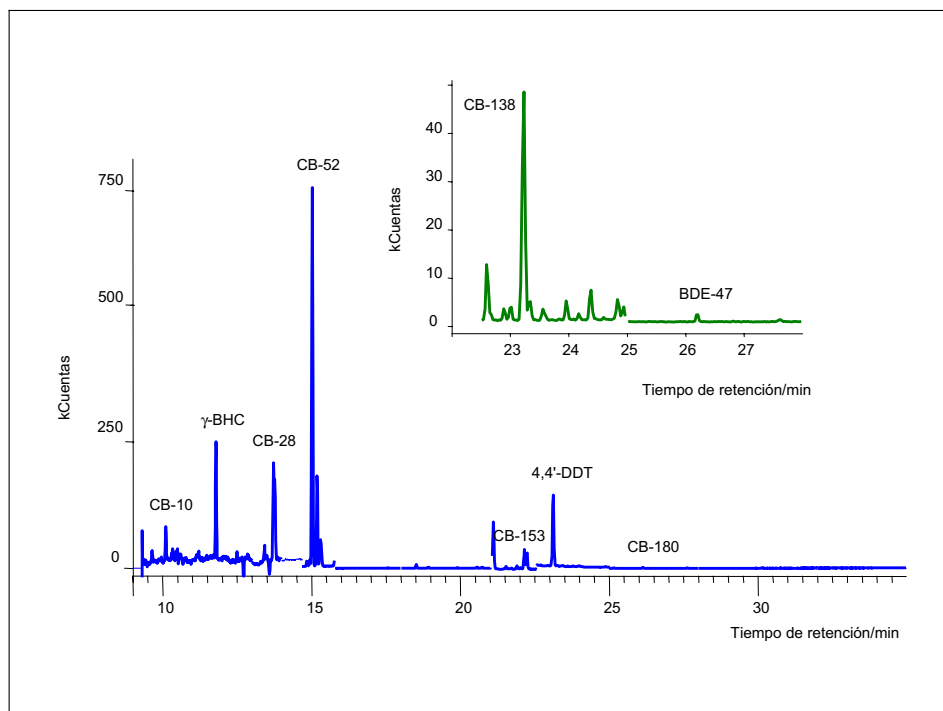


Figura IV.5.19. Cromatograma de una muestra de almeja obtenido mediante GC-MS/MS, extraída mediante SFE-SPME.

1. Hites, R.A.; Foran, J.A.; Carpenter, D.O.; Hamilton, M.C.; Knuth, B.A.; Schwager, S.J., *Science* **303** (2004) 226-229.
2. Certain Brominated Flame Retardants- Polybrominated Diphenylethers, Polybrominated Biphenyls, Hexabromo Cyclodecane; OSPAR Commission (2001).
3. U.S. FDA, Center for food safety and applied nutrition, fish and fisheries products hazards and controls guidance, ed 3 chap 9.
4. Comunicación de la Comisión al Consejo y al Parlamento Europeo sobre las estrategias para el desarrollo sostenible de la acuicultura Europea. Comisión de las Comunidades Europeas, COM 511 (2002), 19/09/2002.

5. Recomendación de la Comisión, de 4 de marzo de 2002, relativa a la reducción de la presencia de dioxinas, furanos y policlorobifenilos (PCB) en los piensos y los alimentos, Diario Oficial de las Comunidades Europeas n° L 067, 09/03/2002, p. 0069 – 0073.
6. Directiva 2002/32/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 7 de mayo de 2002, sobre sustancias indeseables en la alimentación animal. Diario Oficial de las Comunidades Europeas, n° L 140, 30/05/2002, p. 0010 – 0022.
7. Varian Saturn GC/MS Workstation. Software Reference, Varian (1999). p. 373–401.
8. Malavia, J.; Santos, F.J.; Galceran, M.T., *J. Chromatogr. A* **1056** (2004) 171–178.
9. Pitarch, E.; Serrano, R.; López, F.J.; Hernández, F., *Anal. Bioanal. Chem.* **376** (2003) 189–197.
10. Fernández, I.; Dachs, J.; Bayona, J.M., *J. Chromatogr. A* **719** (1996) 77–85.
11. López y López-Leitón, T.J.; Lage Yuste, M.A.; Alvarez Piñeiro, M.E.; Simal Lozano, J., *Chromatographia* **52** (2000) 109–111
12. Ling, Y.C.; Teng, H.C.; Cartwright, C., *J. Chromatogr. A* **835** (1999) 145–157.
13. NemrodW, LPRAI, University of Aix–Marseille III, Marsielle (2000).
14. Lewis, G.A.; Mathien, D.; Phan–Tan–Luu, R., *Pharmaceutical Experimental Design*, Marcel Dekker, New York (1999), p.63.
15. Cortazar, E.; Zuloaga, O.; Sanz, J.; Raposo, J.C.; Etxebarria, N.; Fernández, L.A., *J. Chromatogr. A* **978** (2002) 165–175.
16. Polo, M.; Gómez–Noya, G.; Quintana, J.B.; Llompart, M.; García–Jares, C.; Cela, R., *Anal. Chem.* **76** (2004) 1054–1062.
17. Bras, I.; Santos, L.; Alves, A., *J. Chromatogr. A* **891** (2000) 305–311.

18. Jacobs, M.N.; Covaci, A.; Schepens, P., *Environ. Sci. Technol.* **36** (2002) 2797–2805.
19. Domingo, J.L., *J. Chromatogr. A* **1054** (2004) 321–326.
20. Nardelli, V.; Palermo, C.; Centonze, D., *J. Chromatogr. A* **1034** (2004) 33–40.





## V. CONCLUSIONES

---



A lo largo de esta memoria se han desarrollado varias estrategias de preparación de muestra para la determinación de diversos analitos en muestras del medio acuático.

Además, se ha evaluado la aplicación de la composición estratégica de muestras para la monitorización de plaguicidas organoclorados en muestras de agua.

A continuación se detallan las principales conclusiones que se pueden extraer del trabajo realizado:

#### **V.1. DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE MERCURIO EN MUESTRAS ACUOSAS**

El procedimiento optimizado combina un paso de derivatización con tetraetilborato sódico ( $\text{NaBEt}_4$ ) y extracción simultánea mediante la microextracción en fase sólida (SPME) con el uso de cromatografía de gases con columna multicapilar y detección por MIP-AES, proporcionando una determinación selectiva de compuestos de mercurio en muestras de agua dulce al nivel de ppt ( $2-3 \text{ ng.L}^{-1}$ ).

Se obtienen resultados satisfactorios en sólo 5 min en muestras de agua dulce, mientras que en muestras de agua salada es necesario un mayor tiempo de exposición (10 min) durante la SPME y el calentamiento de la muestra ( $40-70^\circ\text{C}$ ) debido al efecto salino.

Además, se ha comprobado la posibilidad de la determinación simultánea de especies de mercurio y estaño mediante cromatografía de gases acoplada con detección de emisión atómica.

## ***CONCLUSIONES***

---

### **V.2. DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE MERCURIO EN MUESTRAS SÓLIDAS:**

#### **SEDIMENTOS Y MATERIAL BIOLÓGICO**

La extracción de los analitos mediante lixiviación de muestras sólidas con ácido clorhídrico, asistida por microondas, proporciona un método rápido (10 min) y eficiente. Su posterior combinación con un paso de derivatización con tetrafenilborato sódico ( $\text{NaBPh}_4$ )/ microextracción en fase sólida (SPME) y determinación por cromatografía de gases con plasma inducido por microondas–espectrometría de emisión atómica (GC–MIP–AES) permite alcanzar límites de detección de 2–34  $\text{ng.g}^{-1}$ , para 0,5 g de muestra.

El proceso de SPME se encuentra afectado por efectos de matriz, que son satisfactoriamente corregidos mediante el uso de un patrón interno (cloruro de etilmercurio).

El procedimiento se aplicó a varios materiales de referencia obteniendo resultados satisfactorios. En el caso de muestras de sedimentos se produce una sobreestimación de la concentración de metilmercurio debido, probablemente, a un proceso de metilación abiótica durante el proceso de pretratamiento de muestra.

### **V.3. MONITORIZACIÓN DE PLAGUICIDAS ORGANOCLORADOS MEDIANTE**

#### **COMPOSICIÓN ESTRATÉGICA DE MUESTRAS**

La aplicación de procedimientos de composición estratégica de muestras basada en la utilización de diseños experimentales supersaturados se realizó sobre la determinación de plaguicidas organoclorados en muestras de agua mediante SPE y GC–ECD, reduciendo

el número de análisis que tienen que realizarse y, por lo tanto, el coste y el tiempo requerido.

Dependiendo del método de extracción y de sus límites de detección y cuantificación se pueden construir matrices de diferentes tamaños, por lo que es de vital importancia la selección del método de pretratamiento. En este caso se evaluaron dos matrices supersaturadas (12 x 30) y (12 x 24).

La comparación de los resultados obtenidos mediante el análisis individual de las muestras y mediante la composición estratégica de muestras utilizando matrices supersaturadas demuestra que esta última herramienta es capaz de producir estimaciones satisfactorias de las concentraciones de los OCPs en las muestras individuales. En el caso de la matriz (12 x 30), se producen falsos positivos y falsos negativos debido a que el factor de dilución pone en peligro los resultados de las muestras compuestas, ya que las concentraciones resultantes se encuentran por debajo del límite de cuantificación del método seleccionado.

Se ha evaluado la posibilidad de usar equipos automatizados para la preparación de las muestras compuestas de modo que se evitan errores humanos y procedimientos tediosos de trabajo.

### **V.4. DETERMINACIÓN DE PIORRETARDANTES FOSFORADOS Y SUS**

#### **PRODUCTOS DE HIDRÓLISIS EN AGUAS**

El procedimiento desarrollado mediante la combinación de SPE, utilizando cartuchos Oasis HLB, y LC-MS/MS, en modo positivo, permite la determinación de piorretardantes fosforados y plastificantes a niveles de detección de 1-24 ng.L<sup>-1</sup> para 100 mL de muestra, con valores de recuperación entre 60 y 108%.

## ***CONCLUSIONES***

---

La hidrólisis de los piroretardantes fosforados permitió el desarrollo de un procedimiento para la determinación de ésteres de mono-/dialquil fosfato mediante SPE, con cartuchos Lichrolut RP-18, y LC-MS/MS en modo negativo, utilizando tributilamina (TrBA) como formador de par iónico. Las recuperaciones obtenidas para los compuestos cuyos patrones están disponibles comercialmente están en el intervalo comprendido entre 76 y 98%, con unos límites de detección de 2,1-4,2 ng.L<sup>-1</sup> para 100 mL de muestra.

El uso de HPLC permite la determinación de algunos compuestos cuyo análisis mediante GC es complejo (RDP, BDP) o que requeriría un paso de derivatización (productos de hidrólisis). Sin embargo, en su aplicación a muestras de agua residual se producen importantes efectos de matriz que hacen necesaria su cuantificación por el método de adición estándar.

Los métodos desarrollados se aplicaron a la determinación de estos compuestos en aguas residuales de una depuradora, antes y después de su tratamiento, identificándose 12 compuestos: 6 piroretardantes y 6 productos de hidrólisis, en concentraciones comprendidas entre 0,026-61 µg.L<sup>-1</sup> y 0,027-4,7 µg.L<sup>-1</sup> en agua residual sin tratar y tratada, respectivamente.

## **V.5. DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES HALOGENADOS EN MUESTRAS DE ACUICULTURA**

Para la determinación de OCPs, PCBs, PBBs y PBDEs en muestras de acuicultura como piensos, peces y moluscos se desarrollaron diferentes métodos de extracción, SFE y MSPD, además aplicando SPME como método

## ***CONCLUSIONES***

---

de preconcentración, y GC-ECD y GC-MS/MS como técnicas de determinación.

Los métodos de extracción, SFE y MSPD, permiten la limpieza simultánea mediante el uso de adsorbentes en el interior de la celda (SFE) o del cartucho de extracción (MSPD), obteniendo los mejores resultados para la combinación de alúmina básica y gel de sílice acidificado.

La SFE proporciona un método rápido (40 min), automatizado y con una gran reducción del uso de disolventes (2 mL de hexano), además de recuperaciones de 76–119%, y unos límites de detección entre 0,01–0,7 ng.g<sup>-1</sup> para 1 g de muestra.

La MSPD es un método rápido (40 min), sencillo y requiere menor uso de disolvente que los métodos tradicionales (30 mL), pero se realiza de manera manual. Las recuperaciones obtenidas se encuentran entre 50 y 96% y los límites de detección son similares a los de SFE (0,02–0,9 ng.g<sup>-1</sup>).

Además, la aplicación de la SPME sobre los extractos a sequedad durante 60 min, permite alcanzar límites de detección muy bajos (0,3–8,9 pg.g<sup>-1</sup>). Este proceso se ve afectado por efectos matriz, lo que hace necesaria la cuantificación mediante el método de adición estándar, aumentando el tiempo de análisis. Por lo tanto, es recomendable usarlo cuando sea necesario alcanzar límites de detección más bajos que los obtenidos por los métodos de extracción SFE y/o MSPD.

Los métodos desarrollados se aplicaron a la determinación de los OCPs, PCBs, PBBs y PBDEs en muestras de piensos, peces y moluscos, obteniendo concentraciones entre 0,2 y 33 ng.g<sup>-1</sup>. Además, se analizó un material de referencia de tejido de pez mediante los diferentes métodos de

## ***CONCLUSIONES***

---

preparación de muestra obteniendo resultados satisfactorios por todos los métodos para los analitos objetos de este estudio que están presentes en el material.





**ANEXOS**

---



**A.I. Espectros de masas en tándem  
(Electrospray) de ésteres del ácido fosfórico**



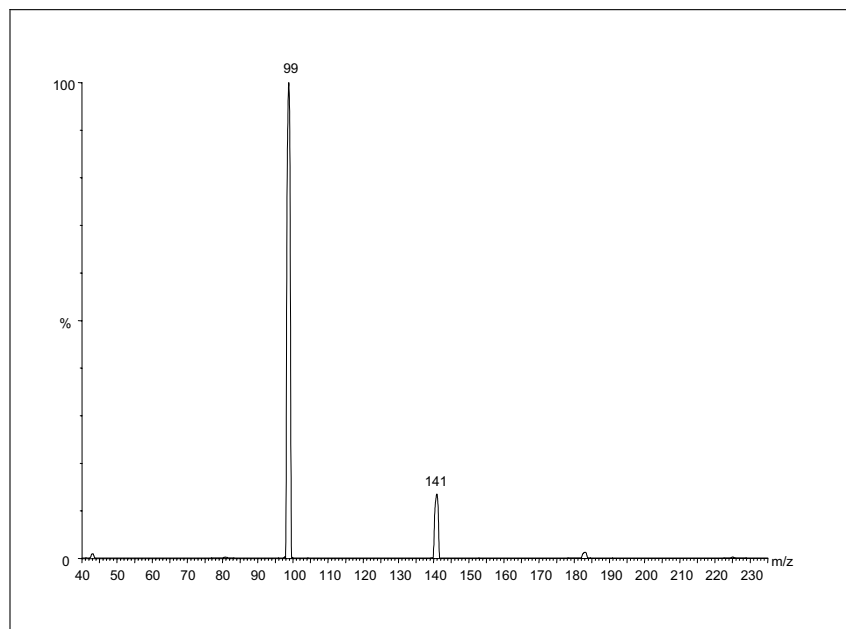


Figura A.I.1. Espectro de MS/MS (ESI+) del TPrP (IS). Ion precursor: 225 m/z; Energía de colisión: 16 eV.

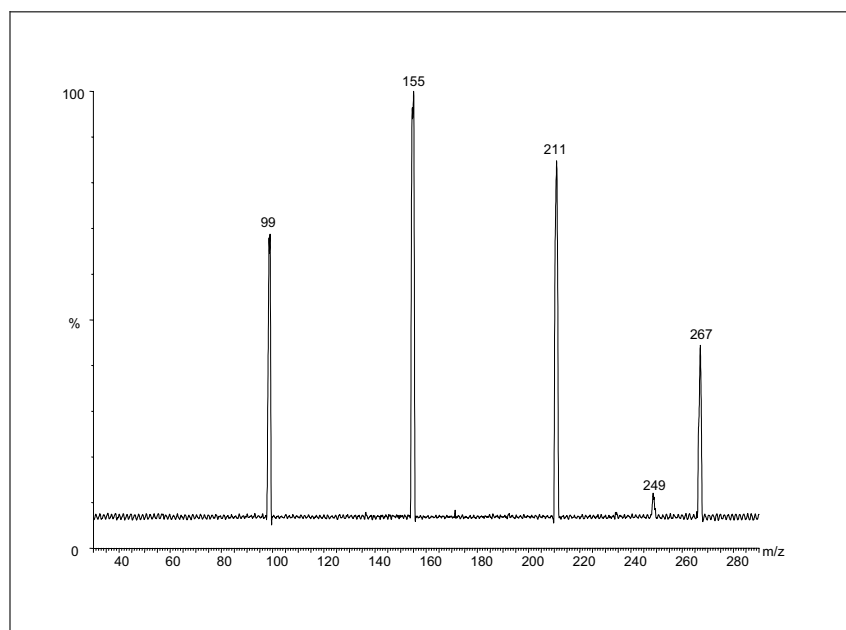


Figura A.I.2. Espectro de MS/MS (ESI+) del TnBP. Ion precursor: 267 m/z; Energía de colisión: 10 eV.

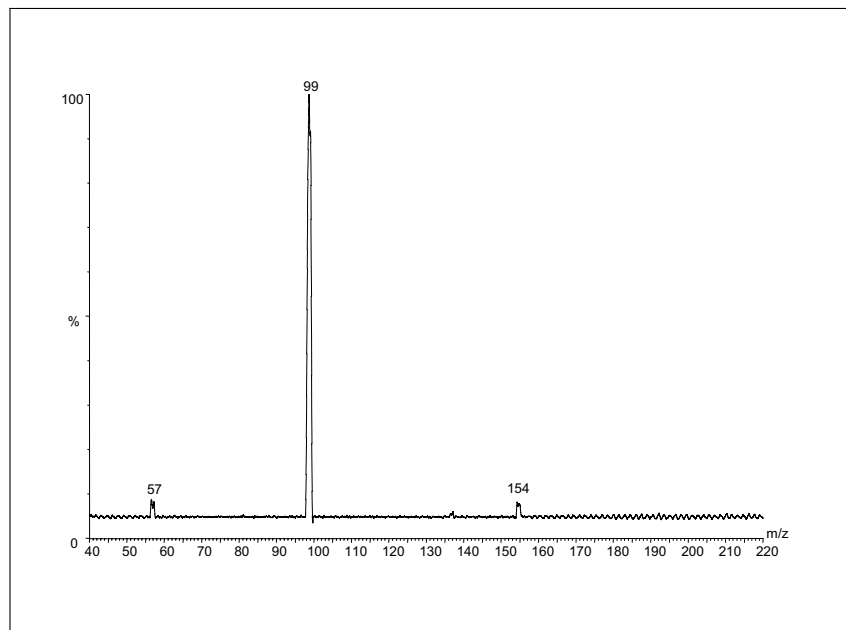


Figura A.I.3. Espectro de MS/MS (ESI+) del TiBP. Ion precursor: 267 m/z; Energía de colisión: 22 eV.

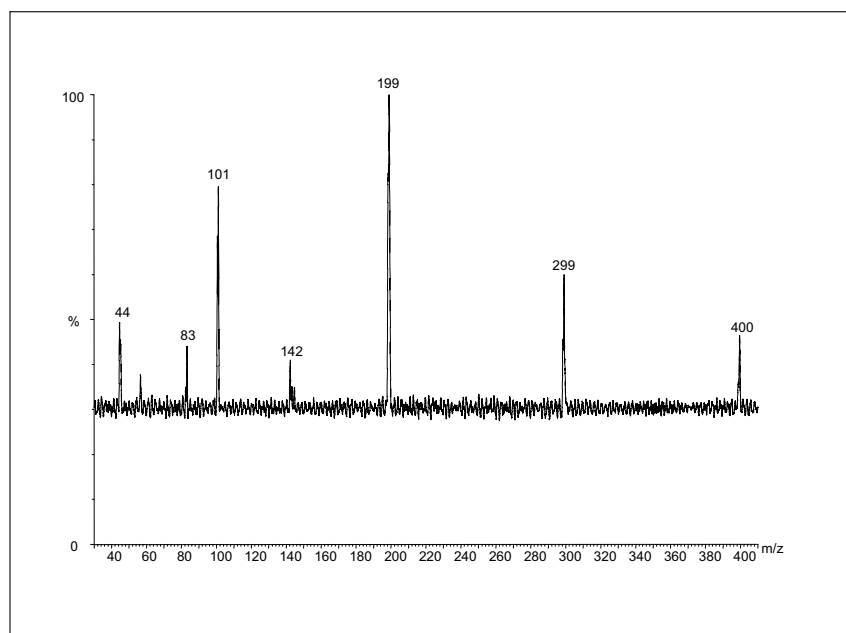


Figura A.I.4. Espectro de MS/MS (ESI+) del TBEP. Ion precursor: 399 m/z; Energía de colisión: 16 eV.

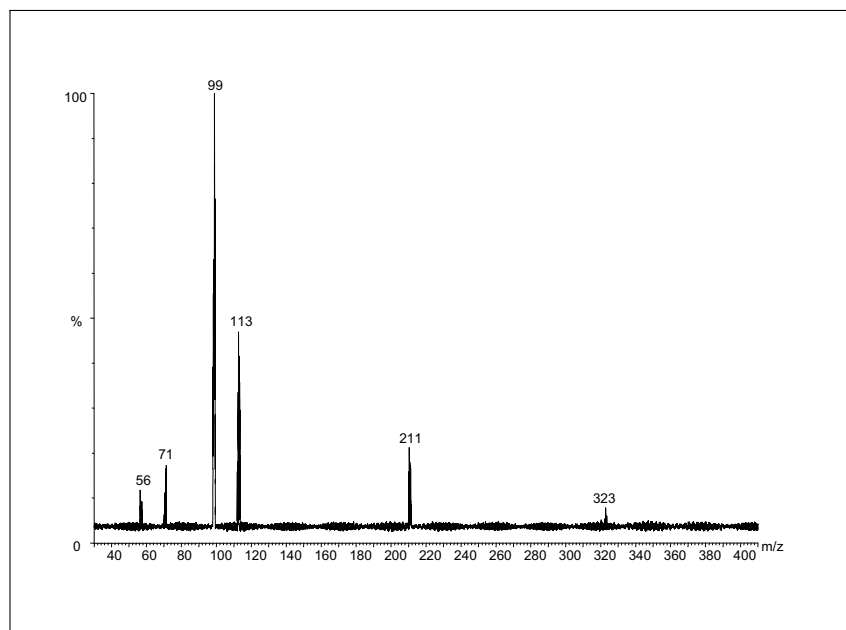


Figura A.I.5. Espectro de MS/MS (ESI+) del TEHP. Ion precursor: 435 m/z; Energía de colisión: 14 eV.

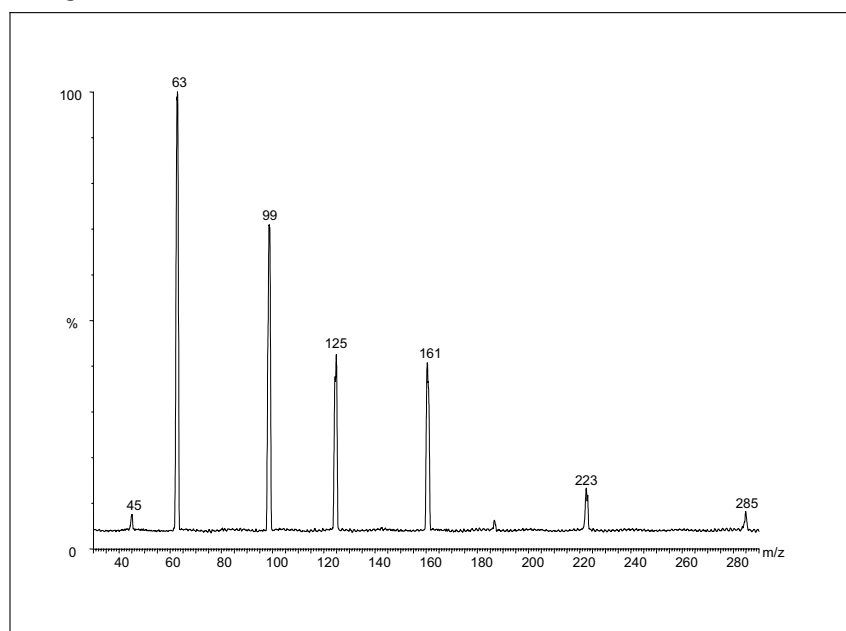


Figura A.I.6. Espectro de MS/MS (ESI+) del TCEP. Ion precursor: 285 m/z; Energía de colisión: 22 eV.

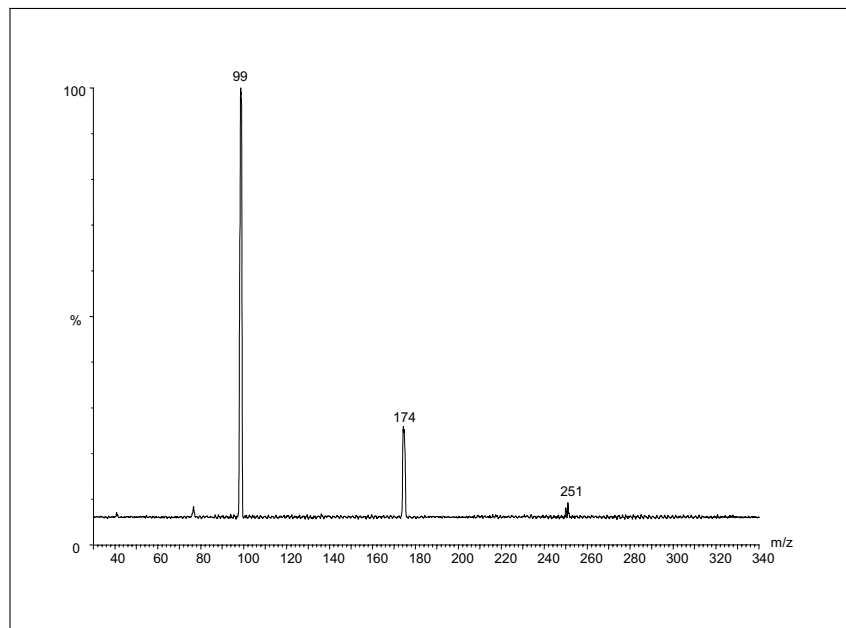


Figura A.I.7. Espectro de MS/MS (ESI+) del TCPP. Ion precursor: 327 m/z; Energía de colisión: 20 eV.

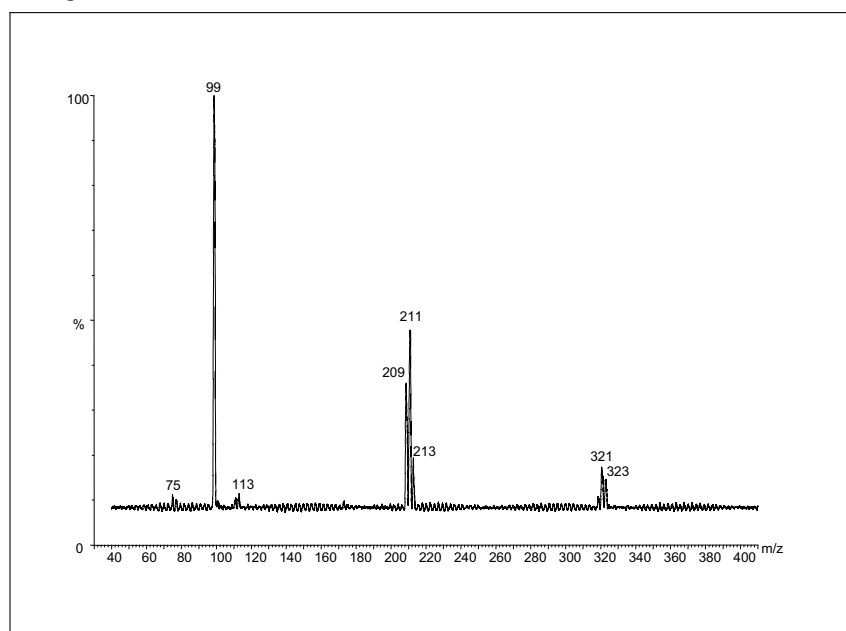


Figura A.I.8. Espectro de MS/MS (ESI+) del TDCP. Ion precursor: 431 m/z; Energía de colisión: 18 eV.



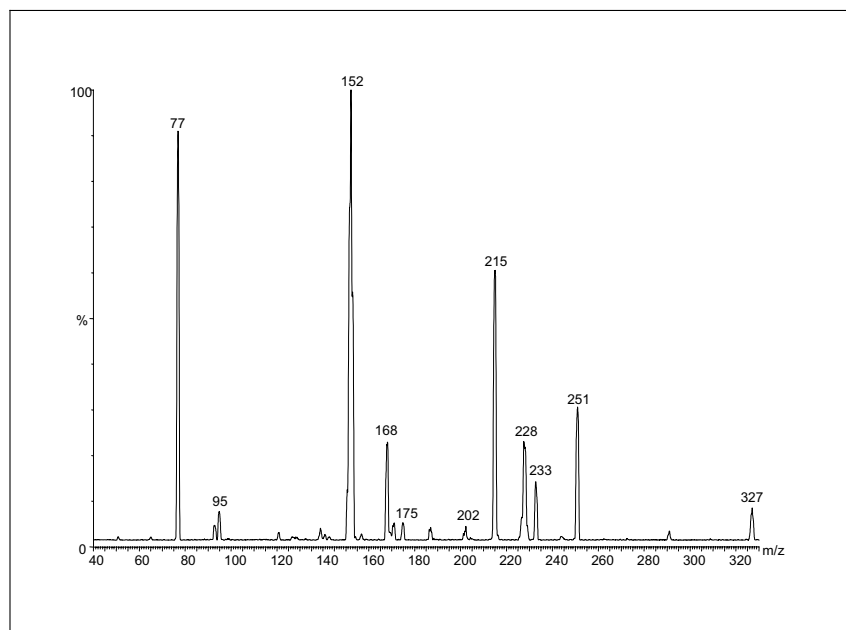


Figura A.I.9. Espectro de MS/MS (ESI+) del TPhP. Ion precursor: 327 m/z; Energía de colisión: 30 eV.

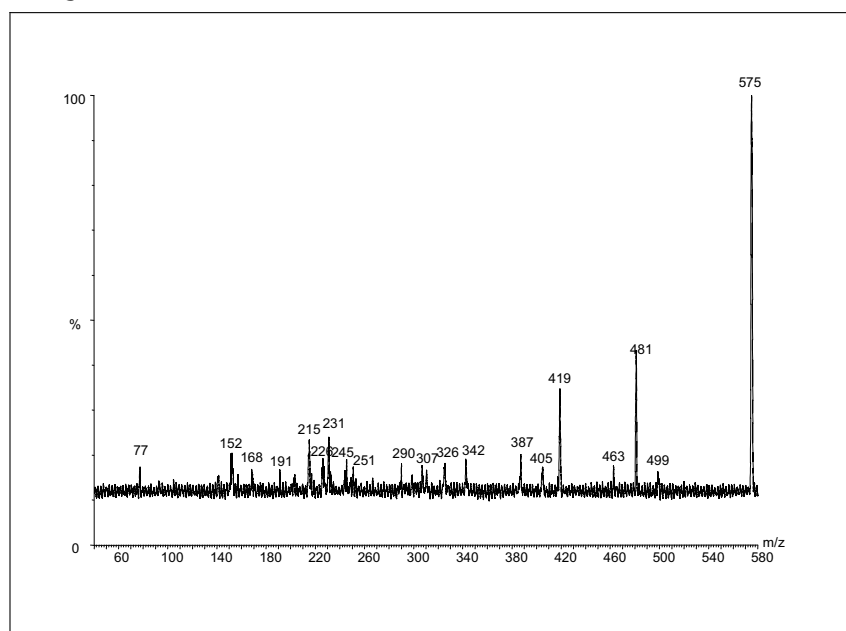


Figura A.I.10. Espectro de MS/MS (ESI+) del RDP. Ion precursor: 575 m/z; Energía de colisión: 35 eV.

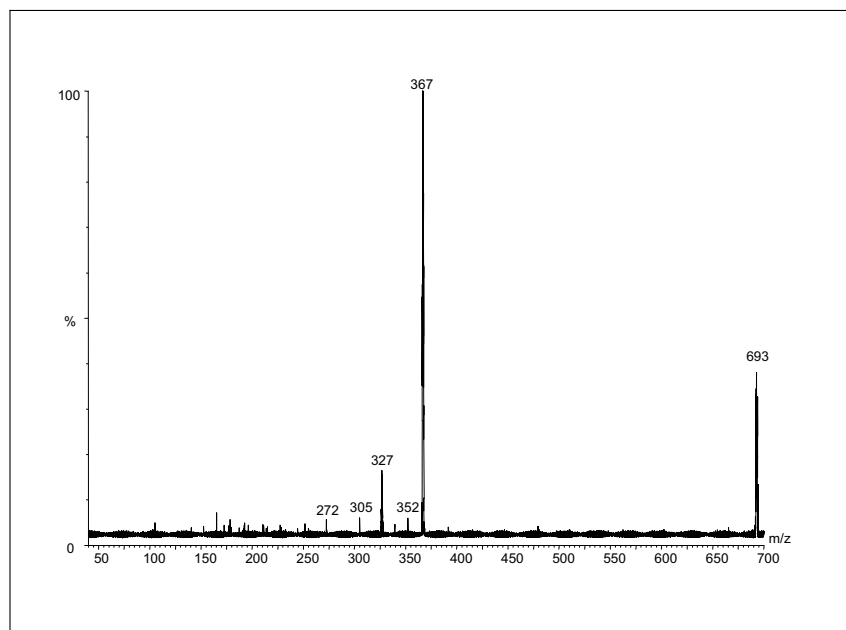


Figura A.I.11. Espectro de MS/MS (ESI+) del BDP. Ion precursor: 693 m/z; Energía de colisión: 28 eV.

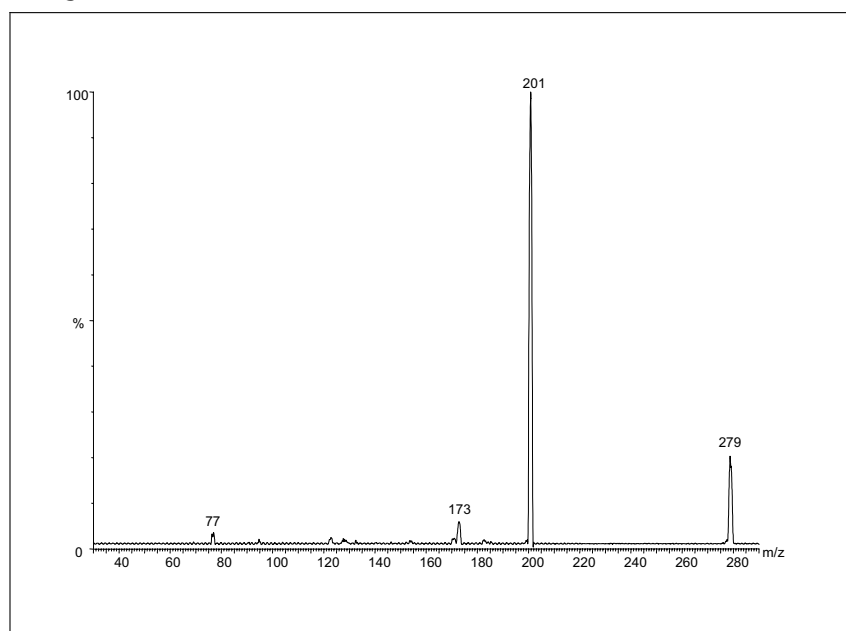


Figura A.I.12. Espectro de MS/MS (ESI+) del TPPO. Ion precursor: 279 m/z; Energía de colisión: 28 eV.

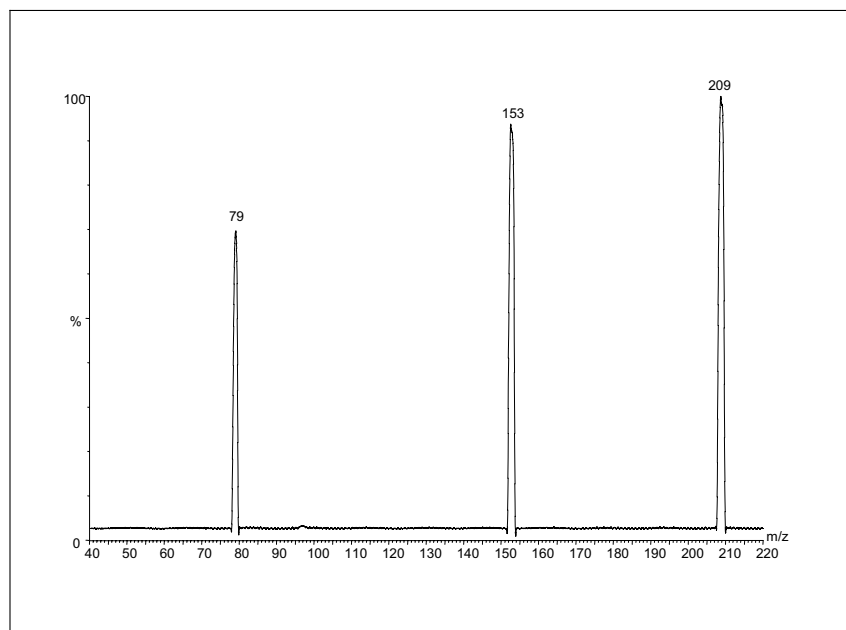


Figura A.I.13. Espectro de MS/MS (ESI-) del DnBP. Ion precursor: 209 m/z; Energía de colisión: 14 eV.

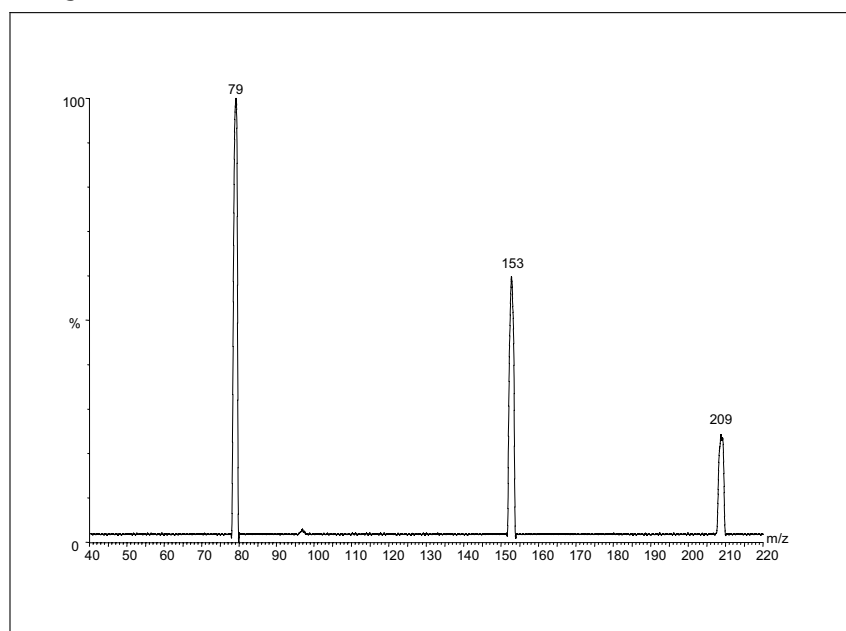


Figura A.I.14. Espectro de MS/MS (ESI-) del DiBP. Ion precursor: 209 m/z; Energía de colisión: 17 eV.

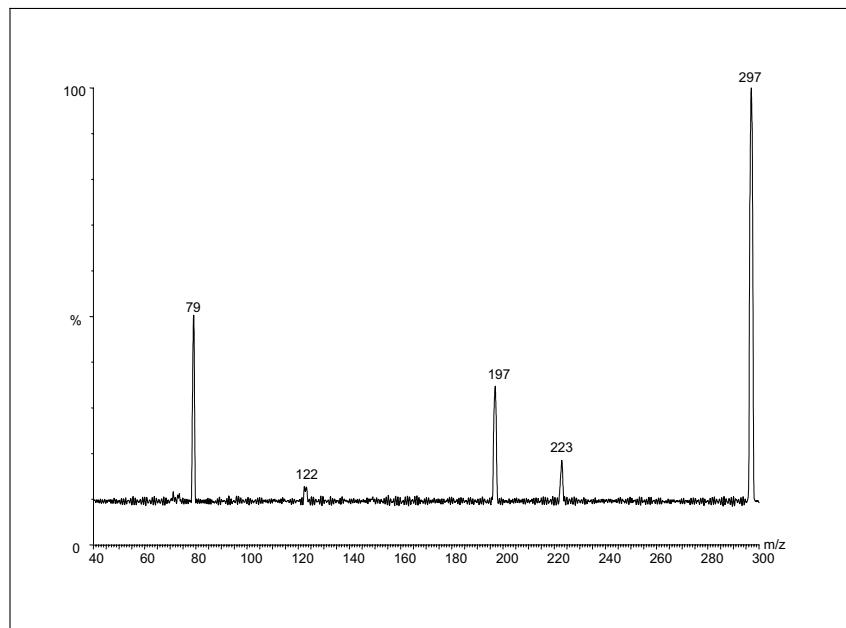


Figura A.I.15. Espectro de MS/MS (ESI-) del DBEP. Ion precursor: 297 m/z; Energía de colisión: 18 eV.

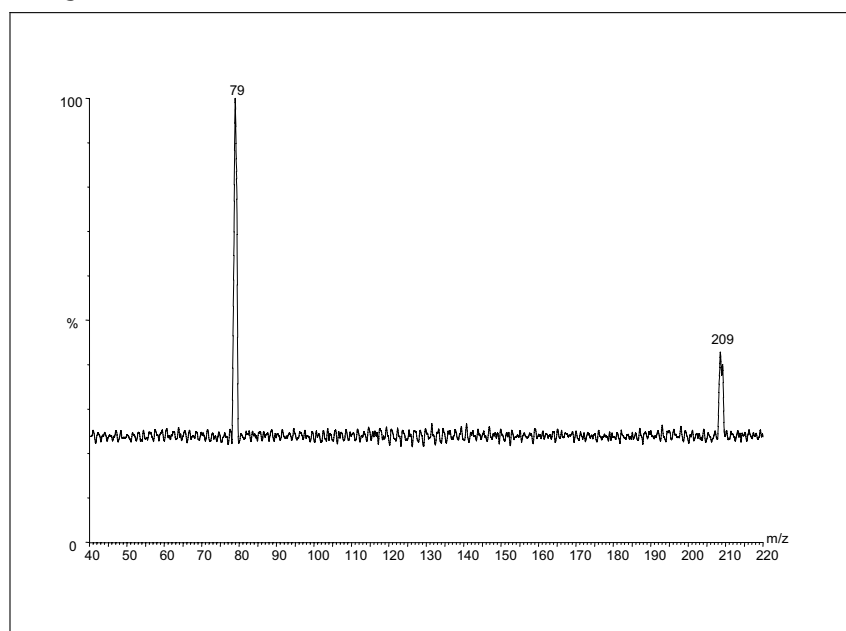


Figura A.I.16. Espectro de MS/MS (ESI-) del DEHP. Ion precursor: 321 m/z; Energía de colisión: 22 eV.

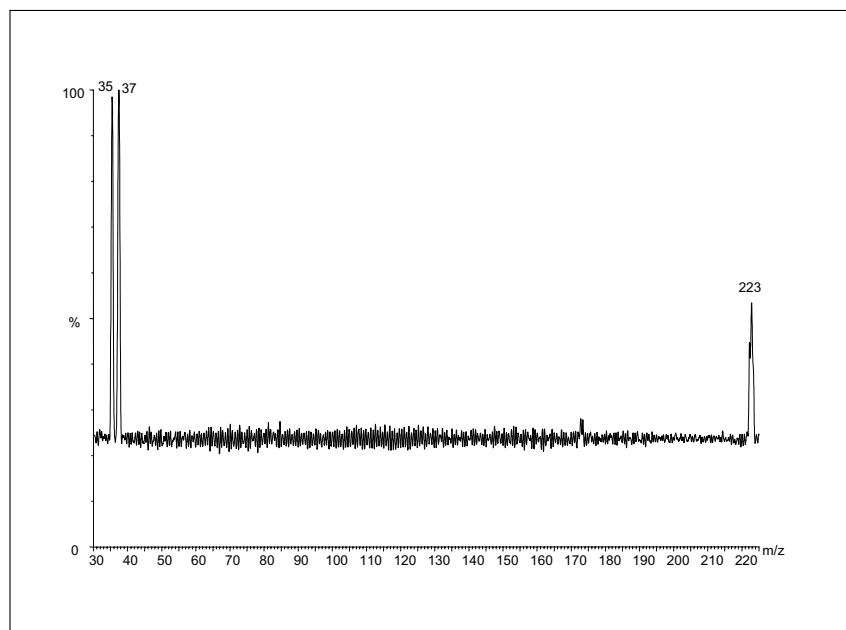


Figura A.I.17. Espectro de MS/MS (ESI-) del DCEP. Ion precursor: 221 m/z;  
Energía de colisión: 8 eV.

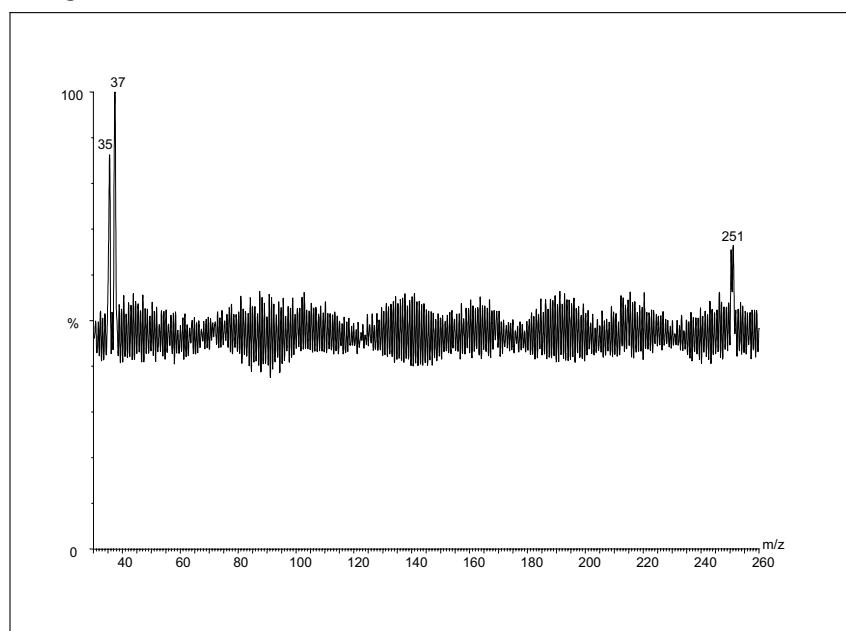


Figura A.I.18. Espectro de MS/MS (ESI-) del DCPD. Ion precursor: 249 m/z;  
Energía de colisión: 8 eV.

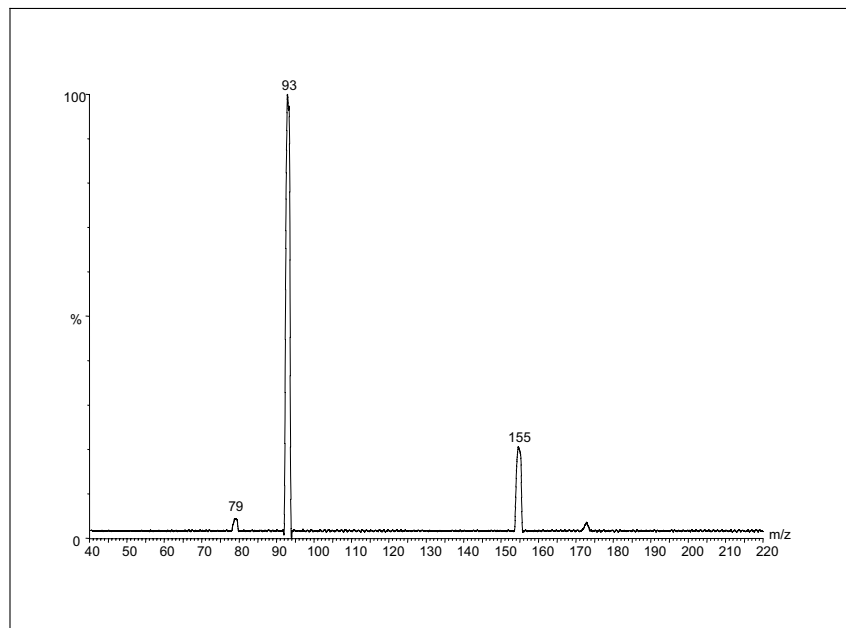


Figura A.I.19. Espectro de MS/MS (ESI-) del DPhP. Ion precursor: 249 m/z; Energía de colisión: 20 eV.

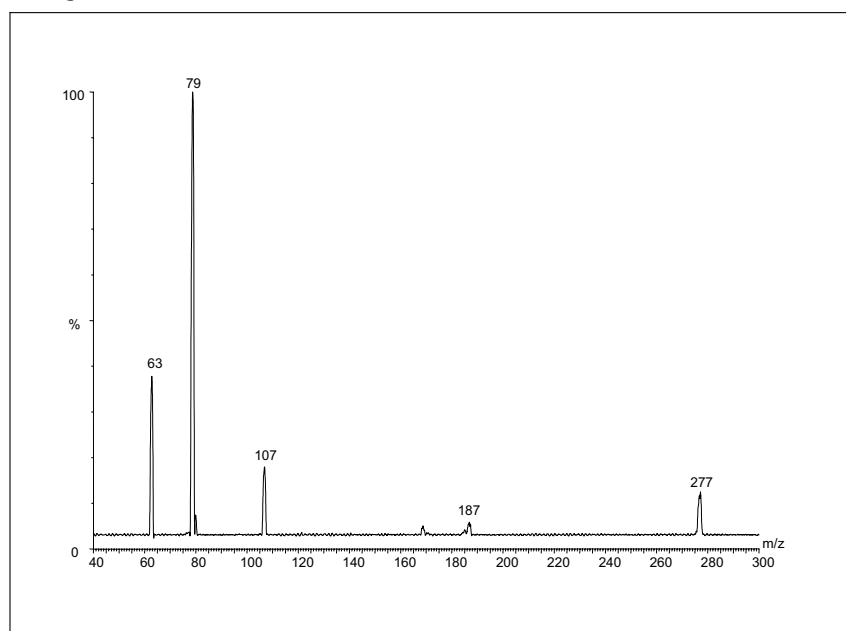


Figura A.I.20. Espectro de MS/MS (ESI-) del DBzP (IS). Ion precursor: 277 m/z; Energía de colisión: 32 eV.

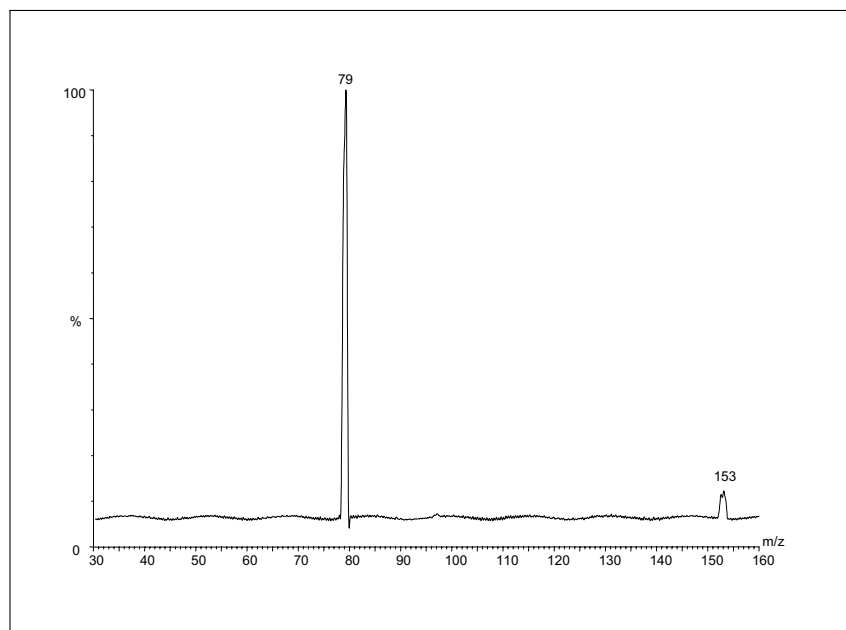


Figura A.I.21. Espectro de MS/MS (ESI-) del MBP. Ion precursor: 153 m/z; Energía de colisión: 14 eV.

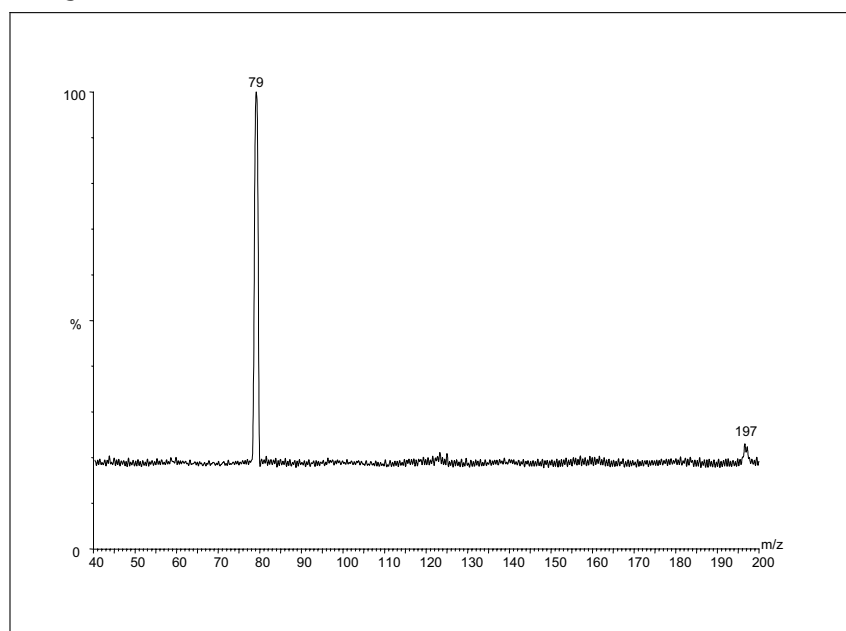


Figura A.I.22. Espectro de MS/MS (ESI-) del MBEP. Ion precursor: 197 m/z; Energía de colisión: 16 eV.

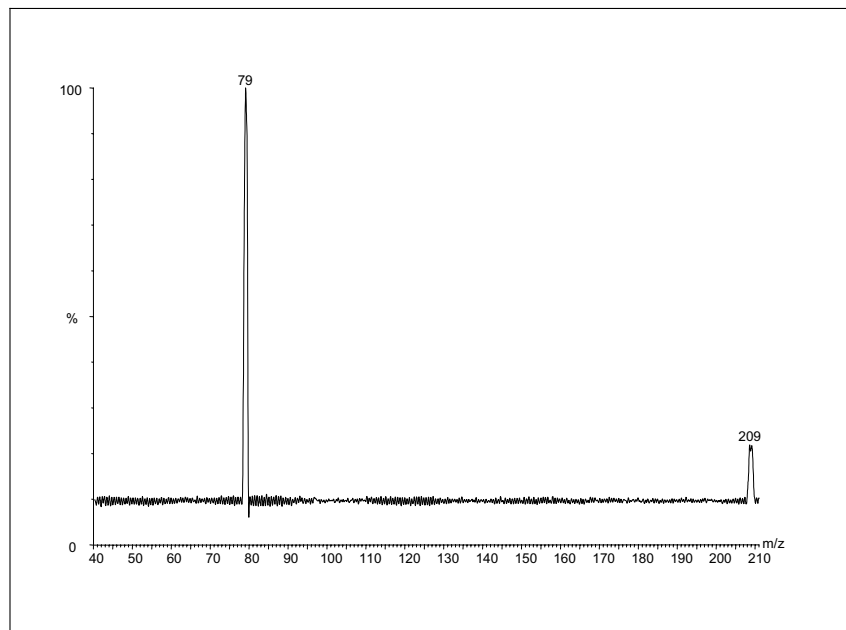


Figura A.I.23. Espectro de MS/MS (ESI-) del MEHP. Ion precursor: 209 m/z; Energía de colisión: 14 eV.

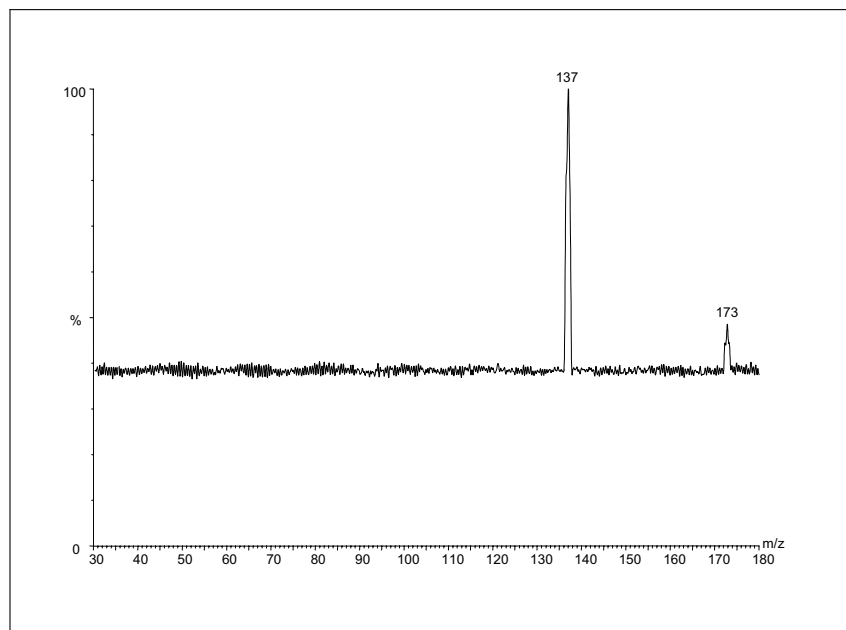


Figura A.I.24. Espectro de MS/MS (ESI-) del MCPPE. Ion precursor: 173 m/z; Energía de colisión: 8 eV.



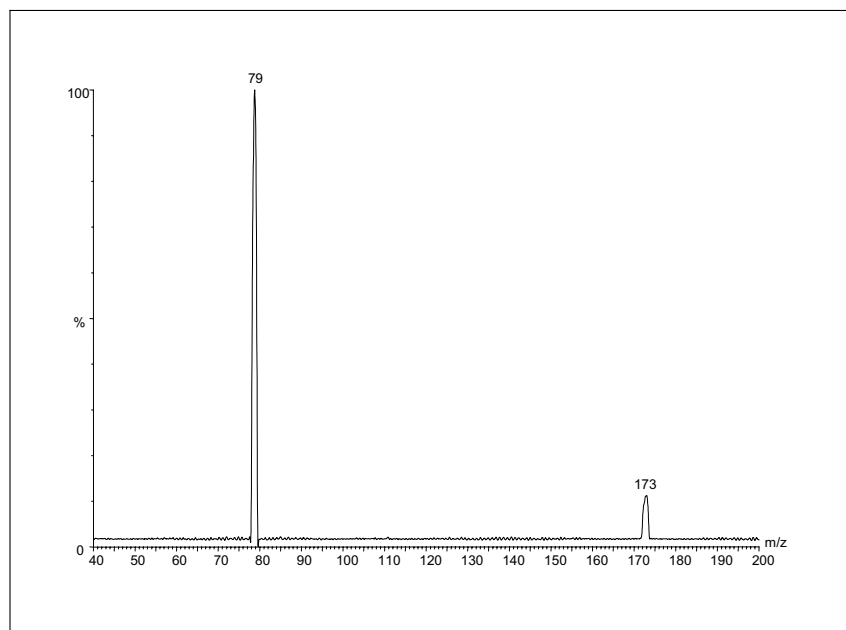
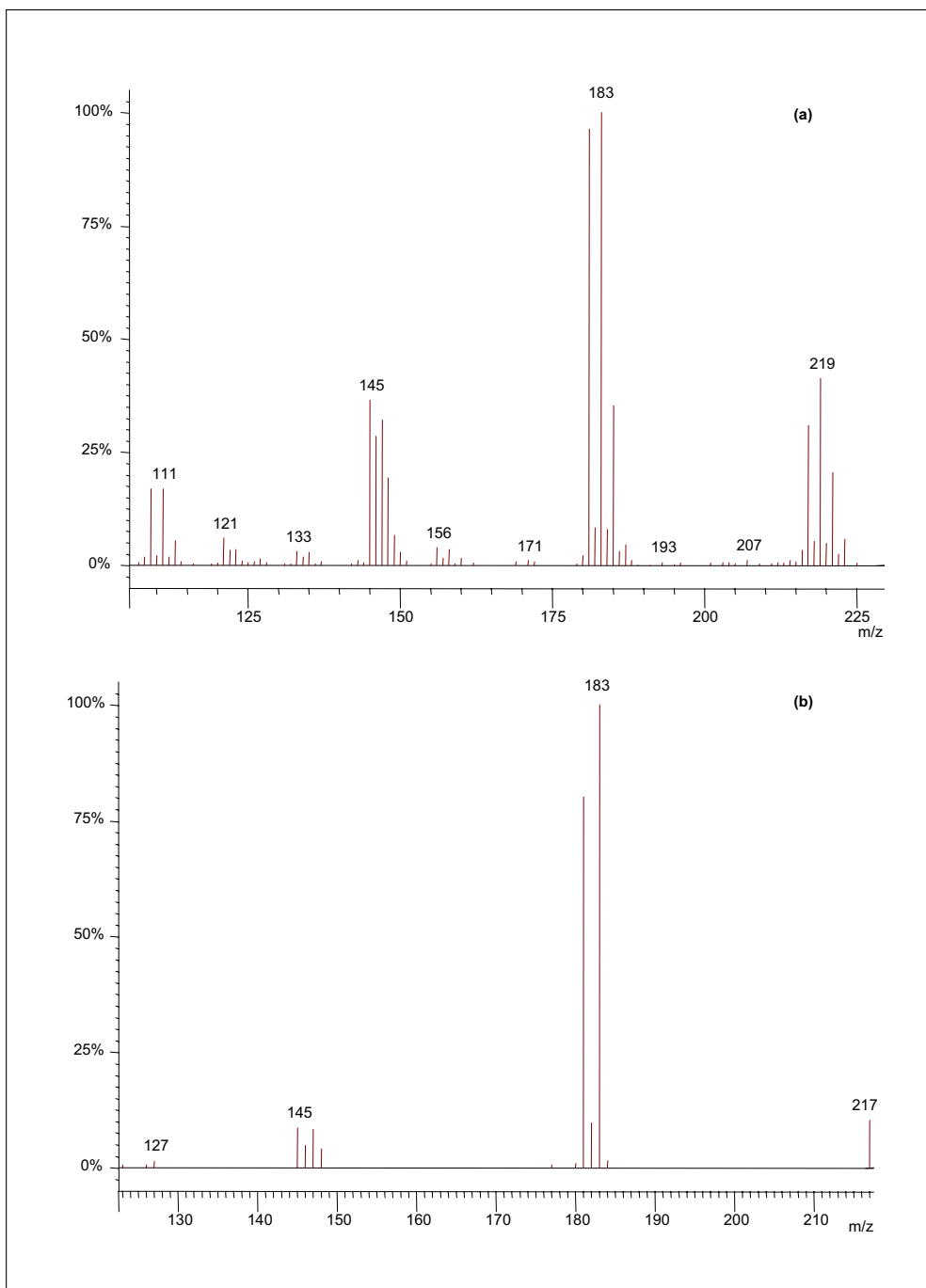


Figura A.I.25. Espectro de MS/MS (ESI-) del MPhP. Ion precursor: 173 m/z; Energía de colisión: 12 eV.



**A.II. Espectros de masas y masas en tándem  
(Impacto Electrónico) de los contaminantes  
halogenados**



Figura A.II.1. Espectro del  $\alpha$ -HCH. (a) MS (EI); (b) MS/MS (EI).

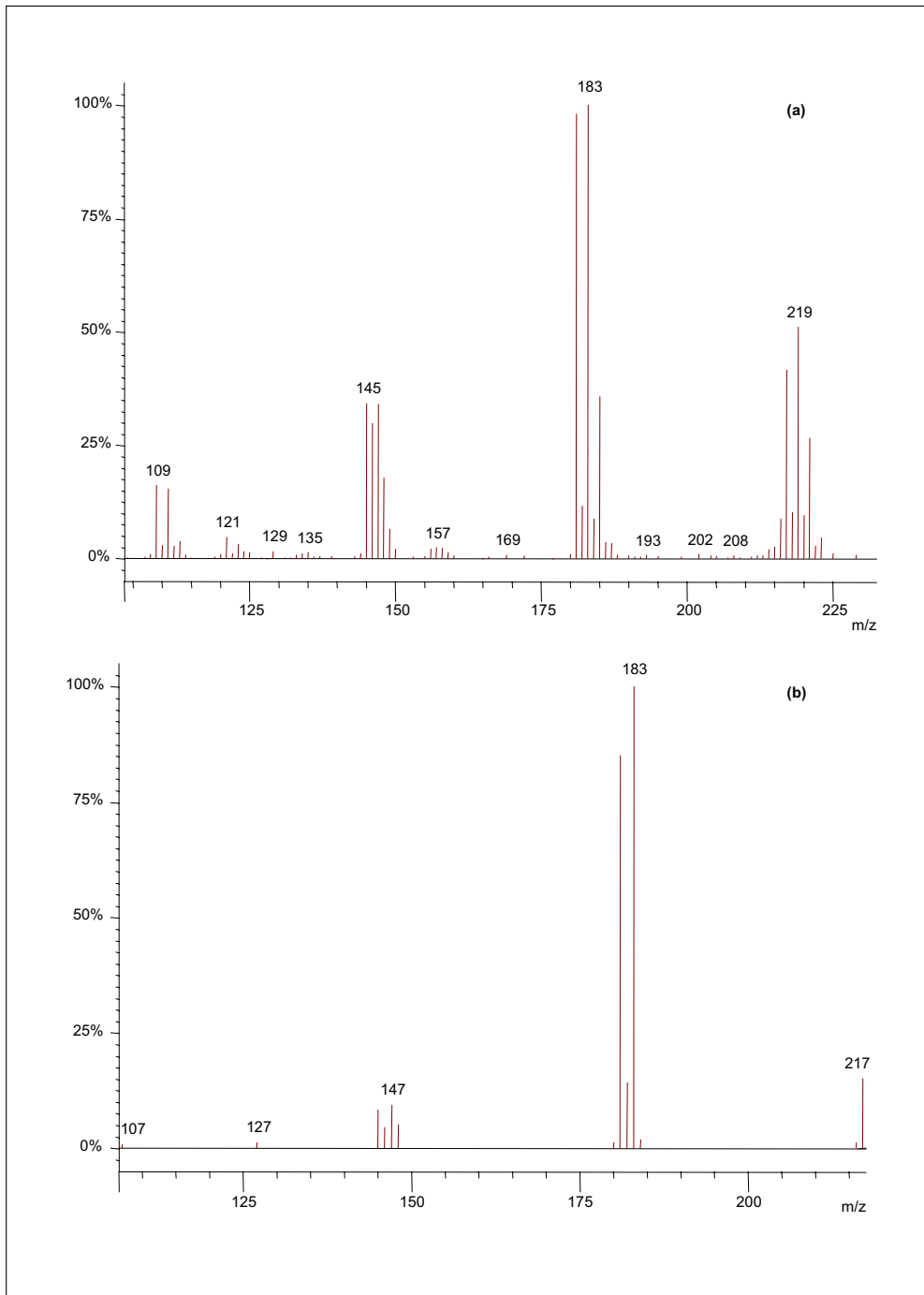


Figura A.II.2. Espectro del  $\gamma$ -HCH. (a) MS (EI); (b) MS/MS (EI).

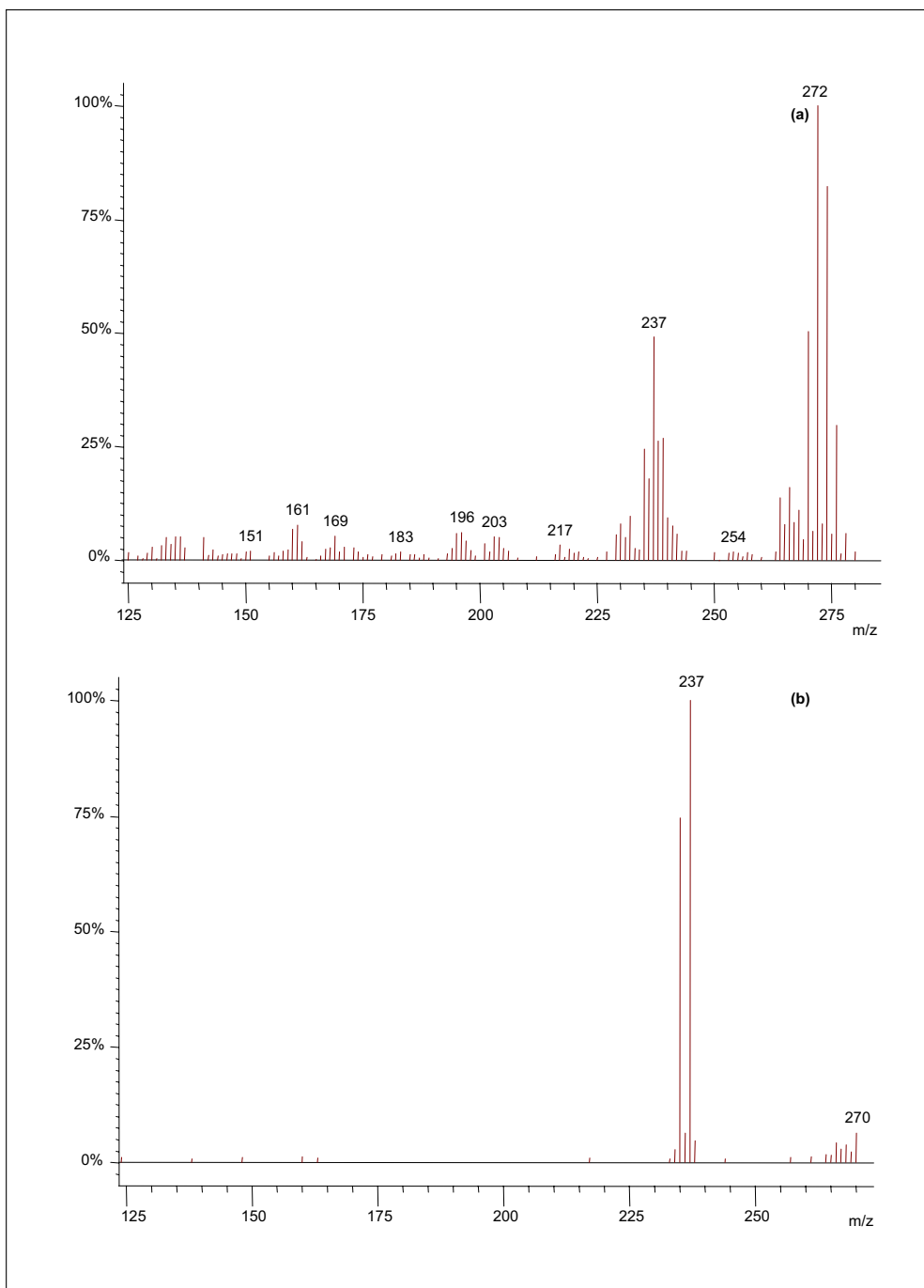


Figura A.II.3. Espectro del Heptachloro. (a) MS (EI); (b) MS/MS (EI).

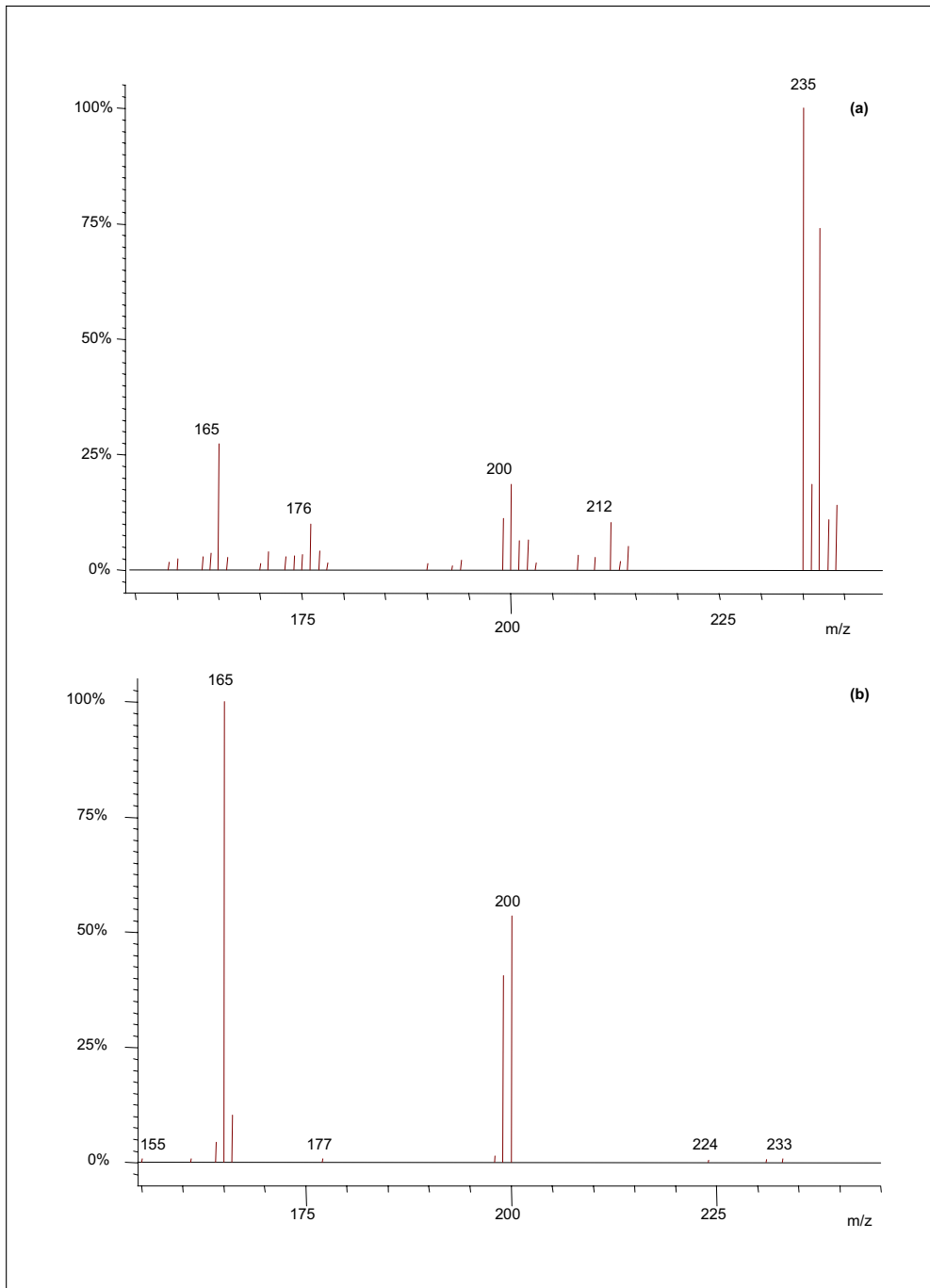


Figura A.II.4. Espectro del 4,4'-DDT. (a) MS (EI); (b) MS/MS (EI).



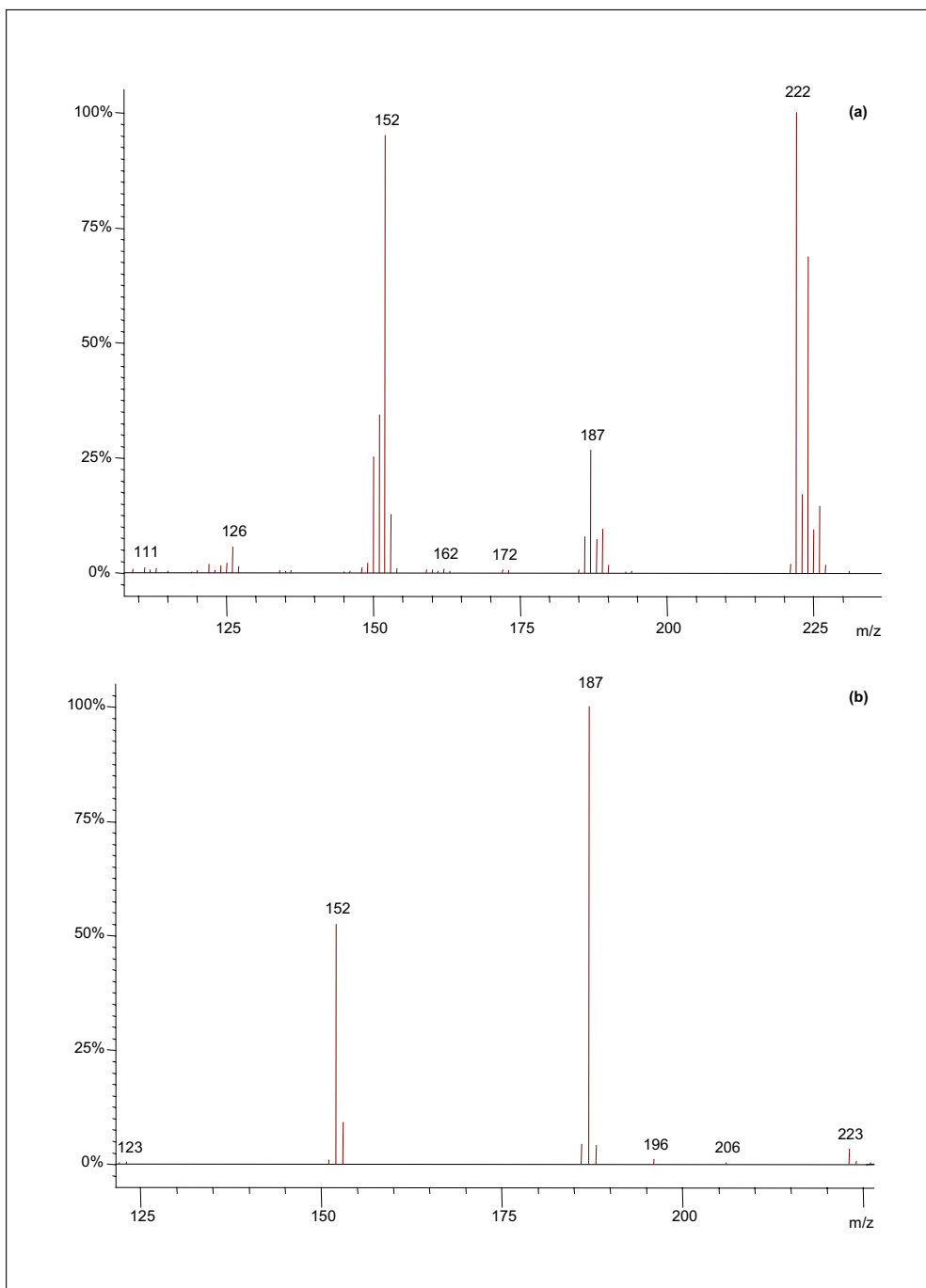


Figura A.II.5. Espectro del CB-10. (a) MS (EI); (b) MS/MS (EI).

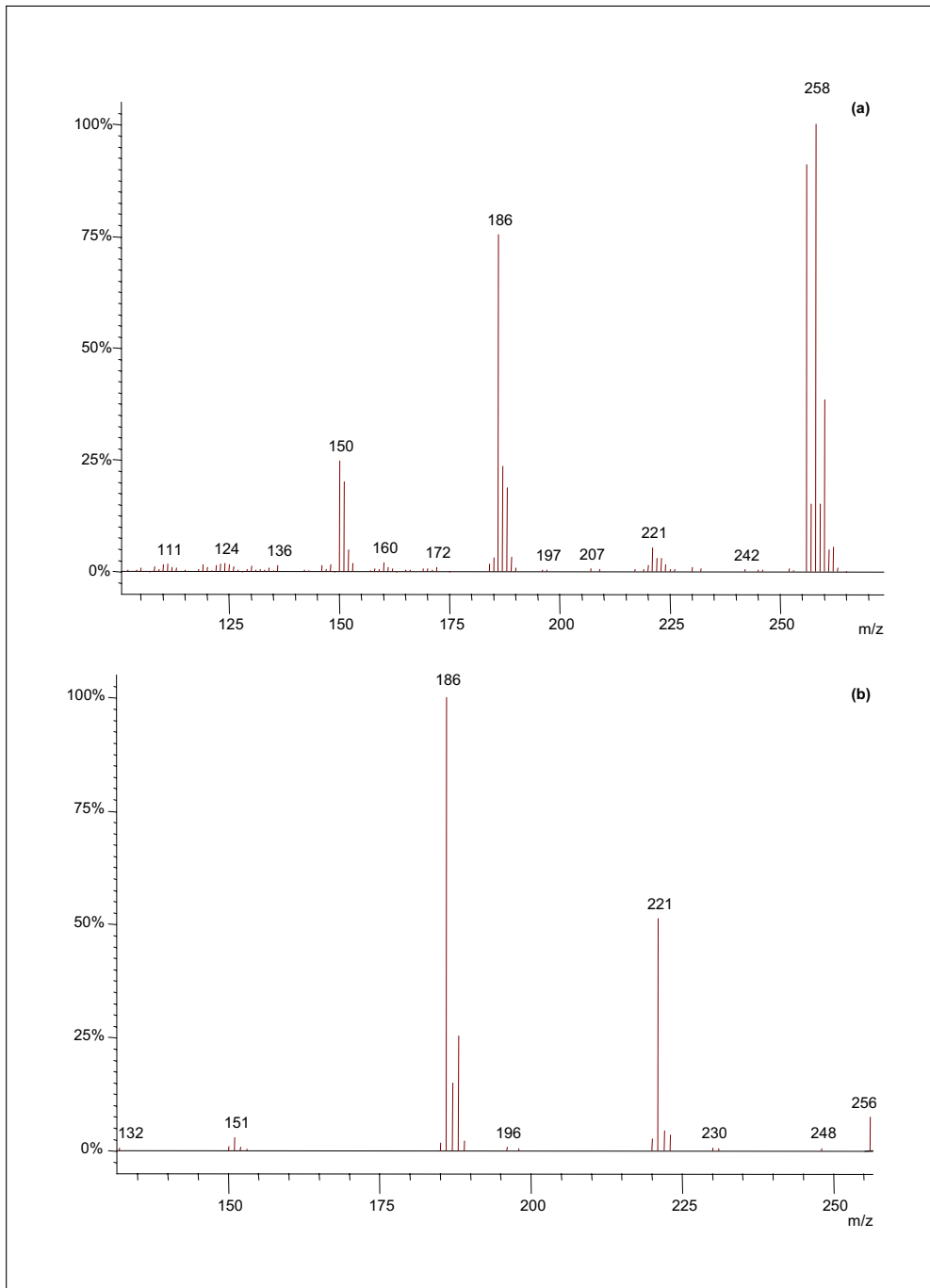


Figura A.II.6. Espectro del CB-28. (a) MS (EI); (b) MS/MS (EI).

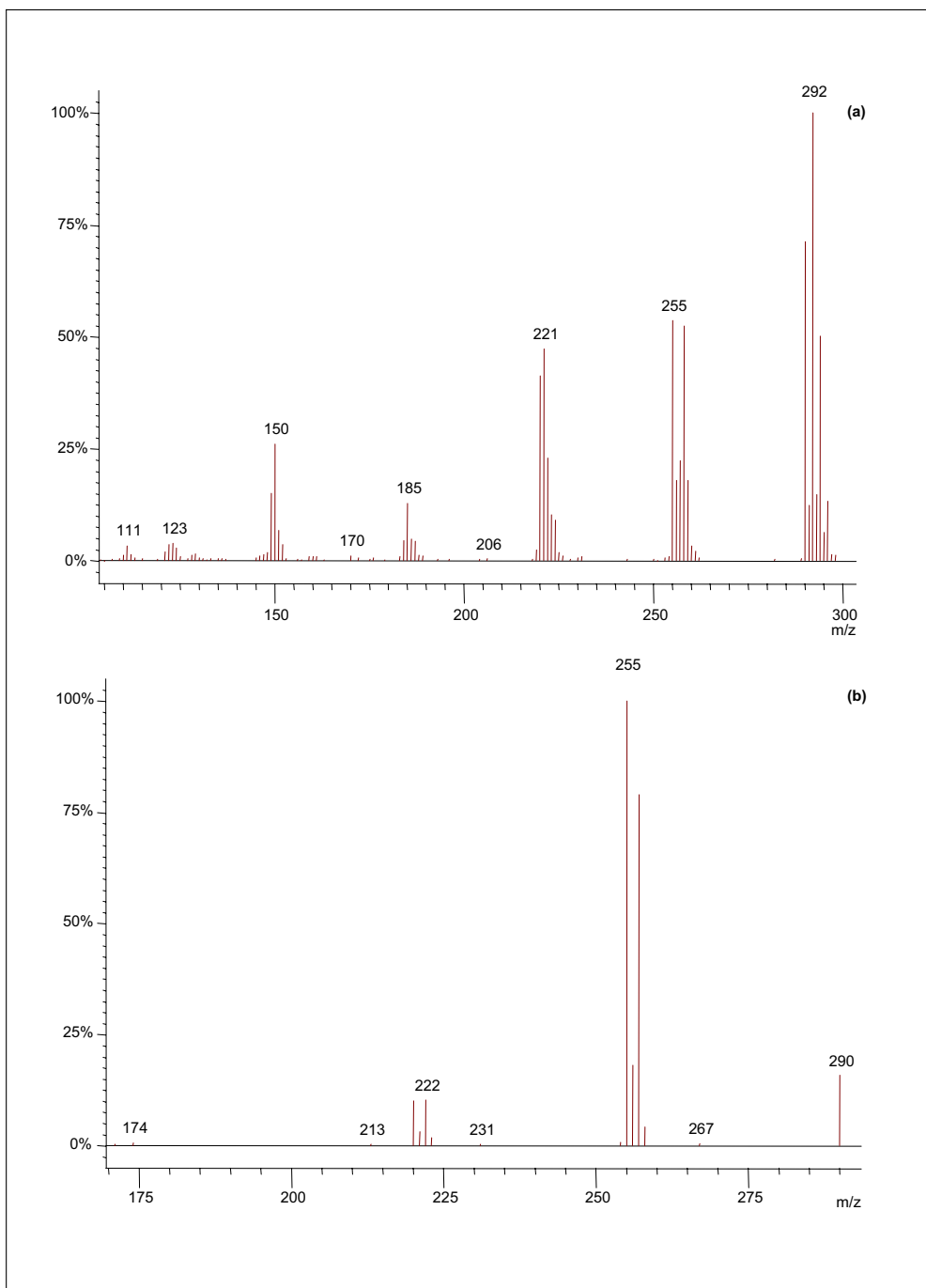


Figura A.II.7. Espectro del CB-52. (a) MS (EI); (b) MS/MS (EI).

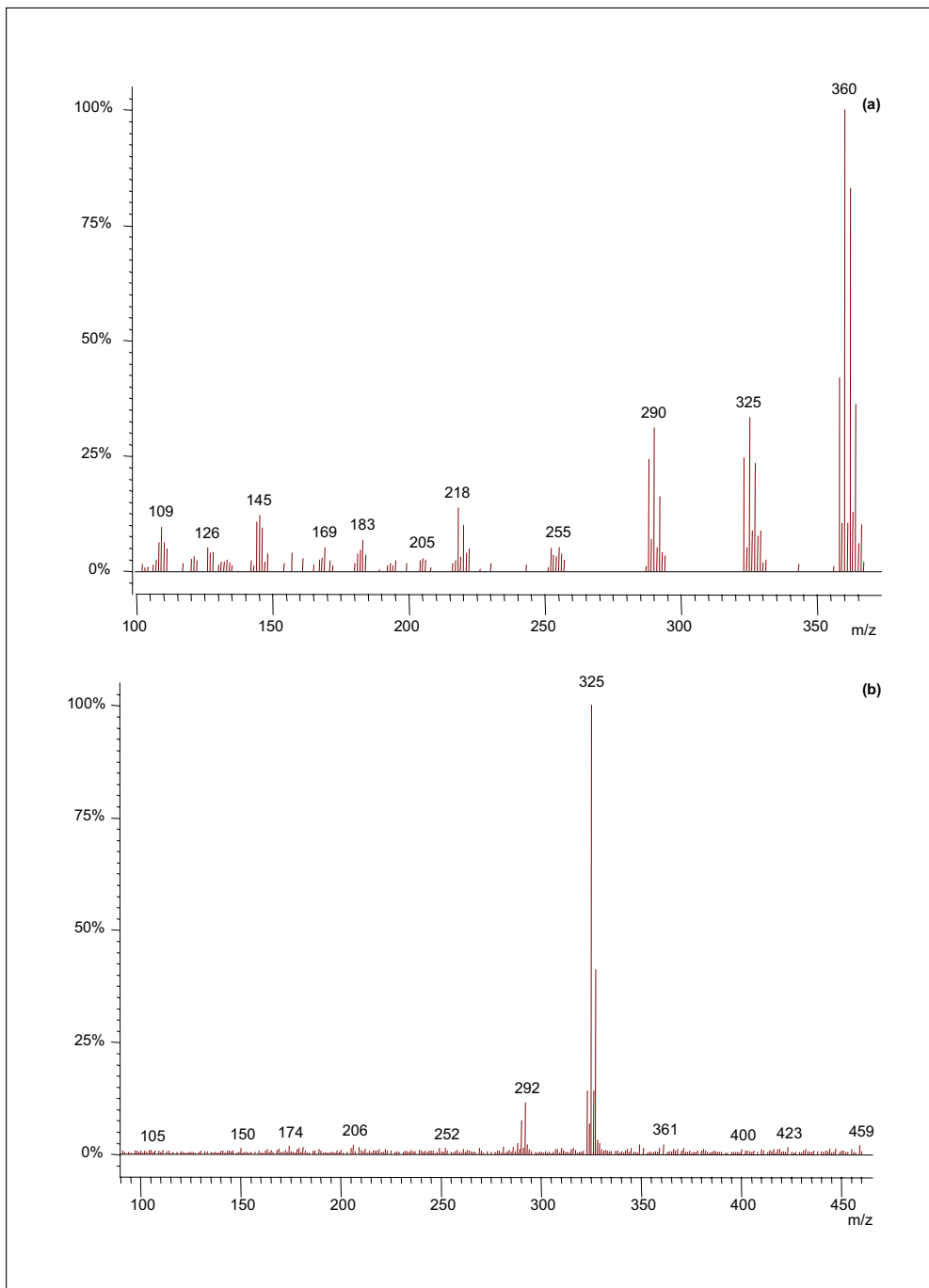


Figura A.II.8. Espectro del CB-138. (a) MS (EI); (b) MS/MS (EI).

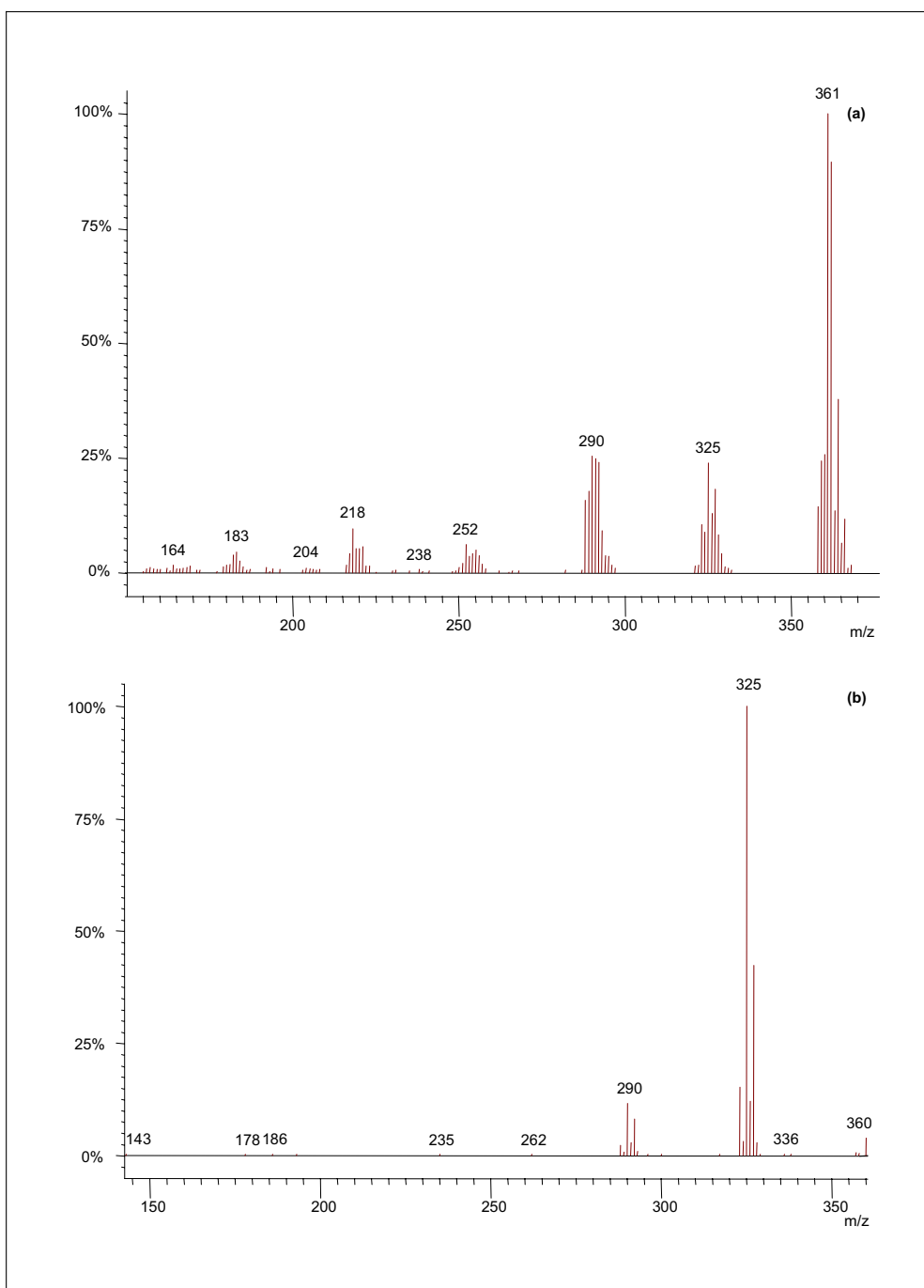


Figura A.II.9. Espectro del CB-153. (a) MS (EI); (b) MS/MS (EI).

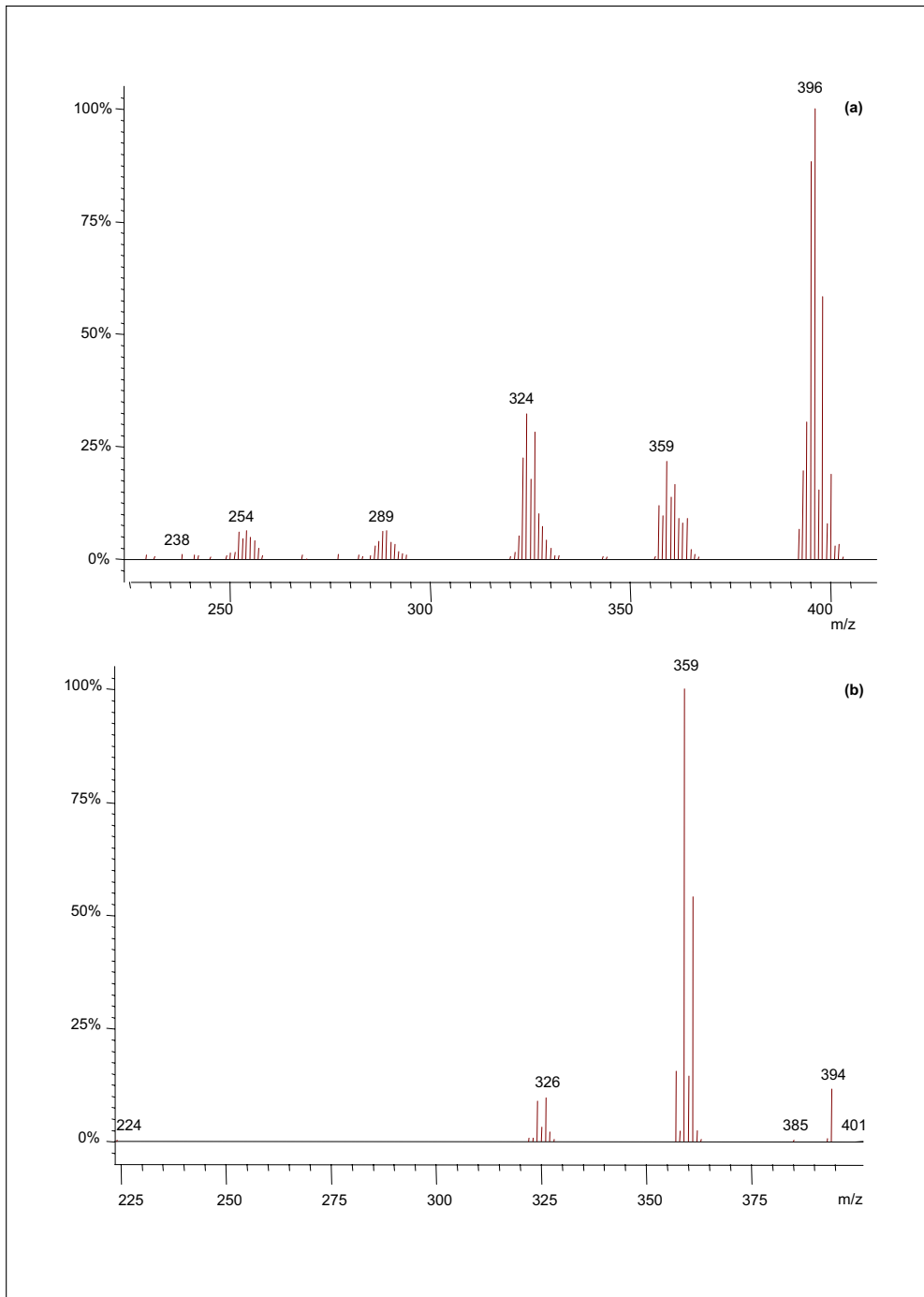


Figura A.II.10. Espectro del CB-180. (a) MS (EI); (b) MS/MS (EI).

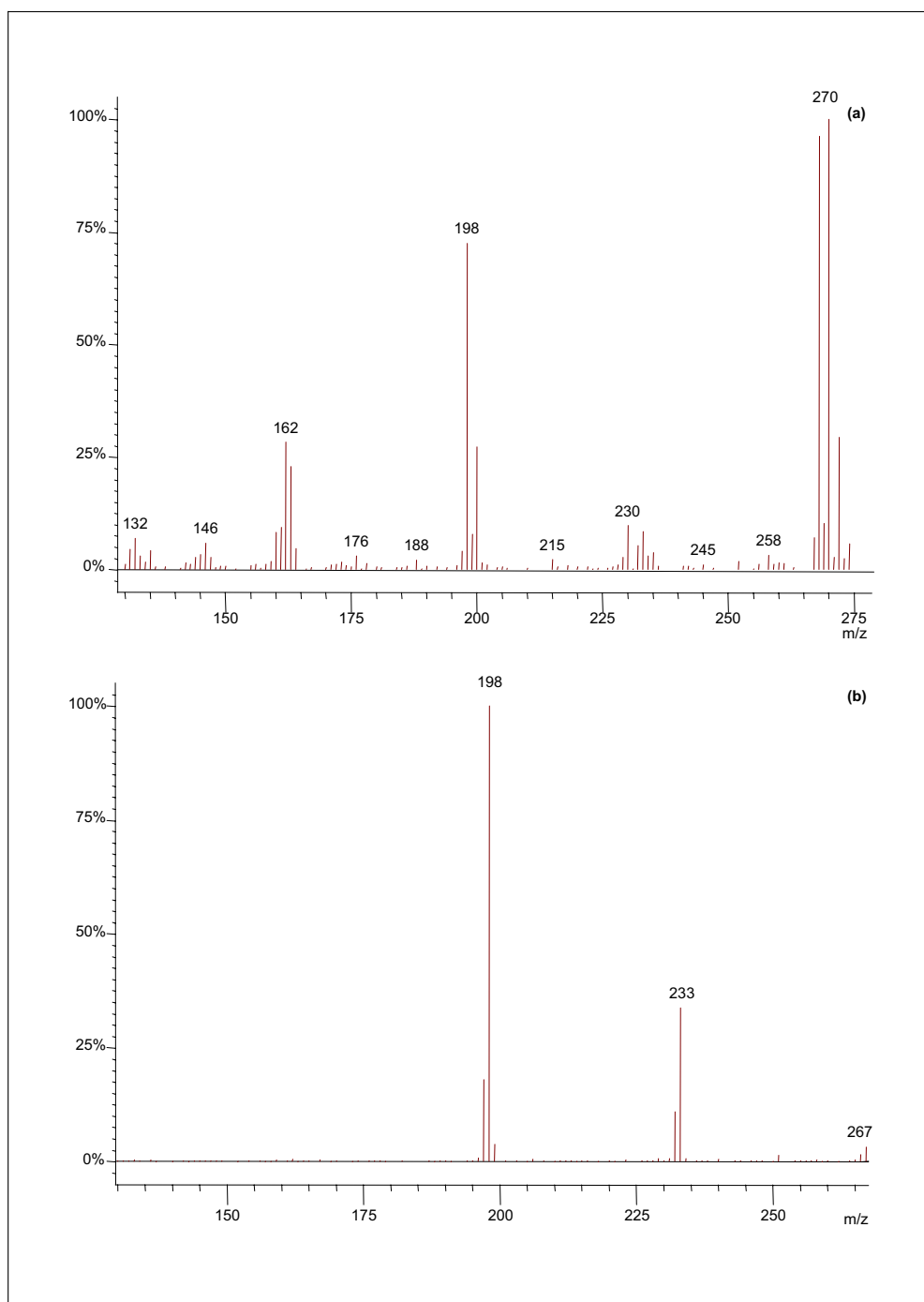


Figura A.II.11. Espectro del  $^{13}\text{C}$ -CB-28 . (a) MS (EI); (b) MS/MS (EI).

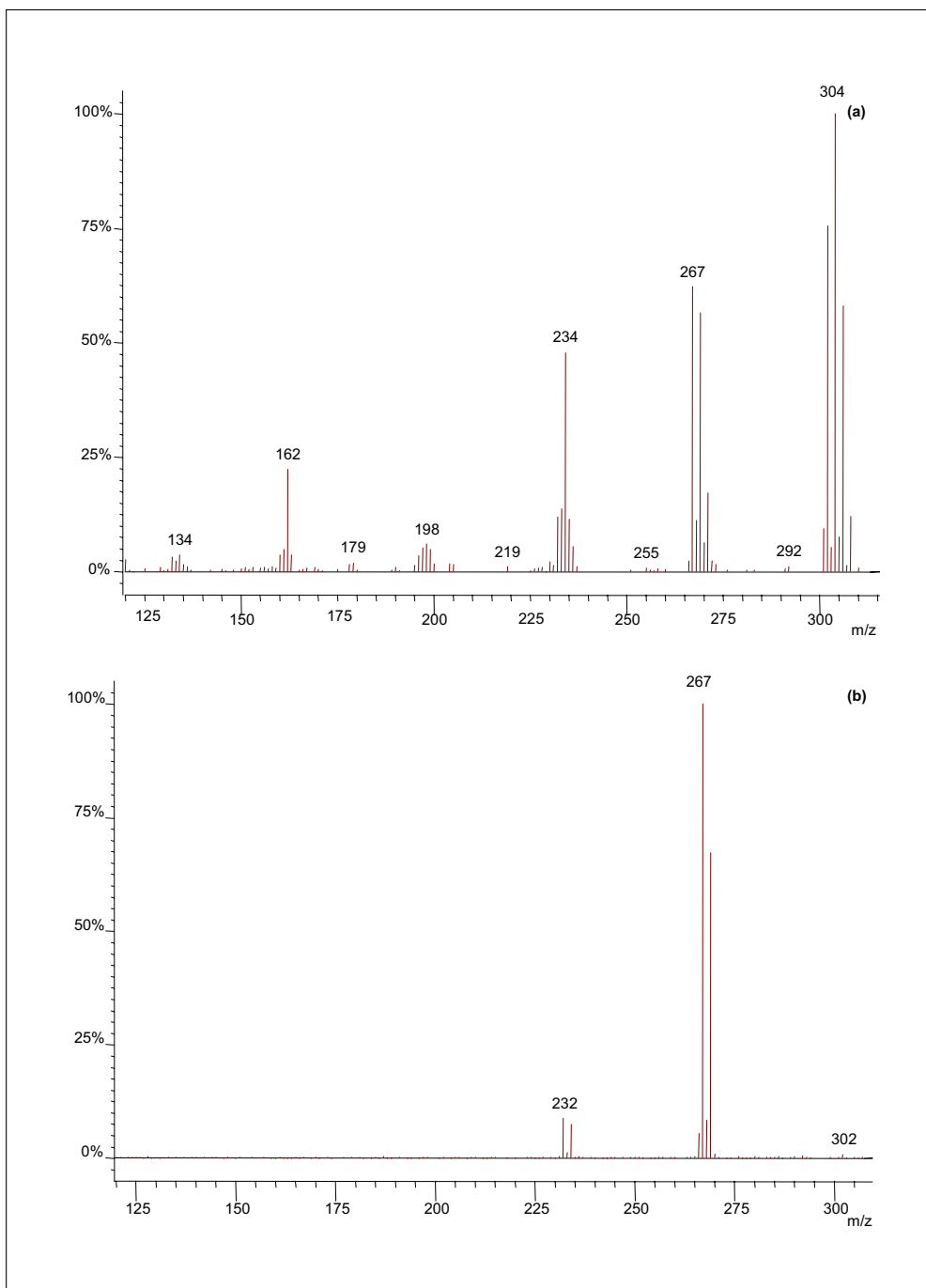


Figura A.II.12. Espectro del  $^{13}\text{C}$ -CB-52. (a) MS (EI); (b) MS/MS (EI).



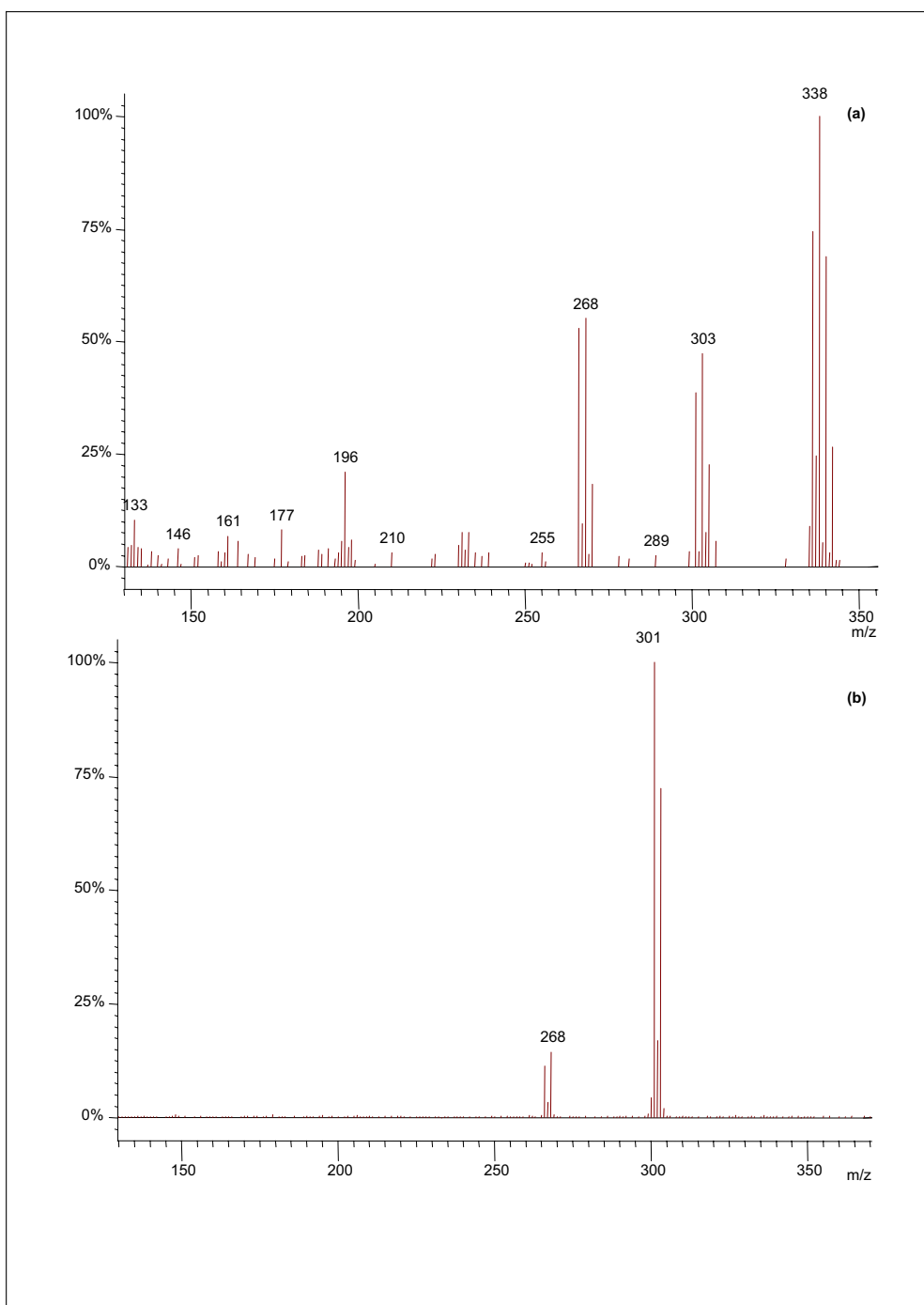


Figura A.II.13. Espectro del  $^{13}\text{C-CB-101}$ . (a) MS (EI); (b) MS/MS (EI).

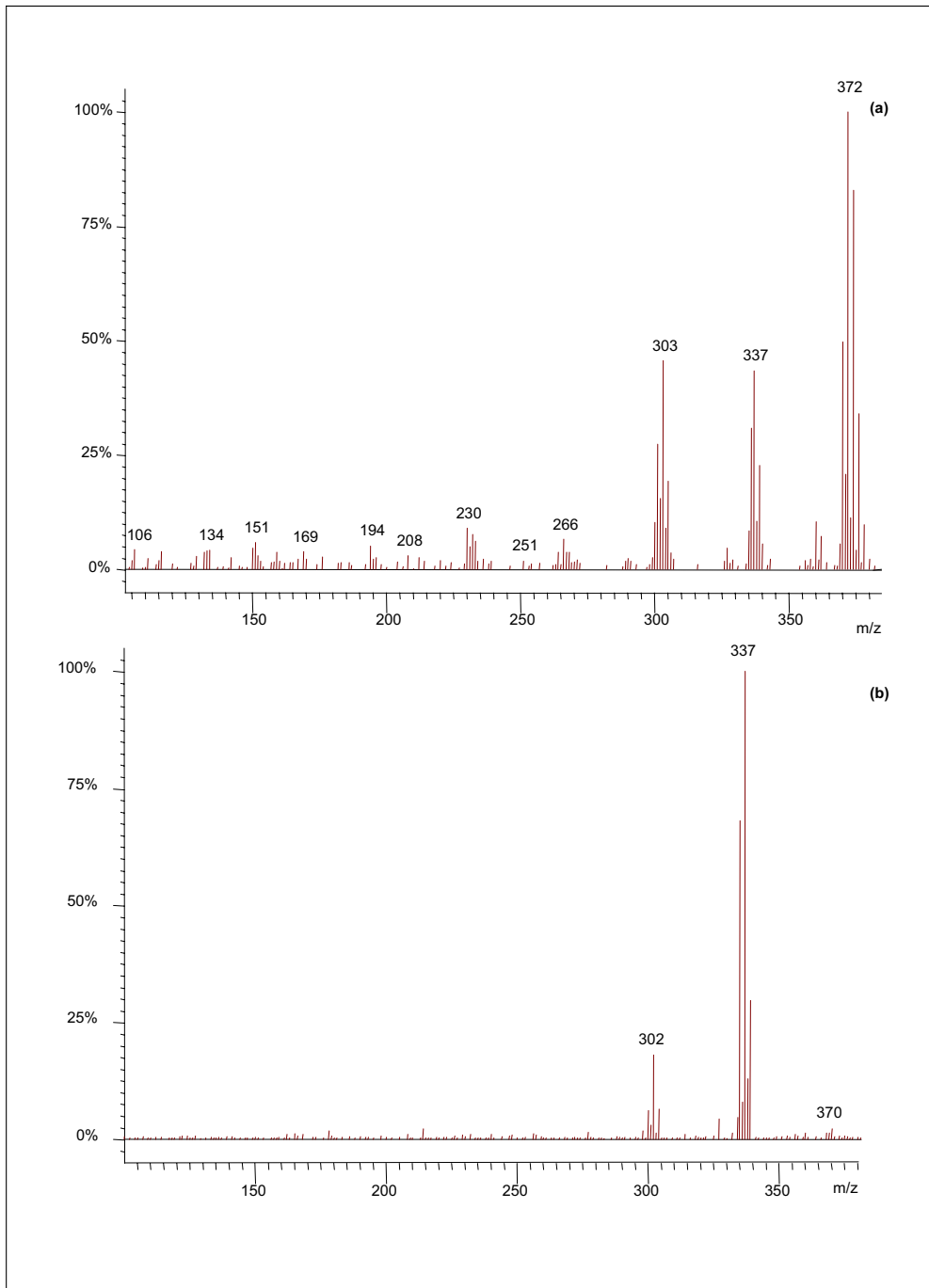


Figura A.II.14. Espectro del  $^{13}\text{C}$ -CB-138. (a) MS (EI); (b) MS/MS (EI).

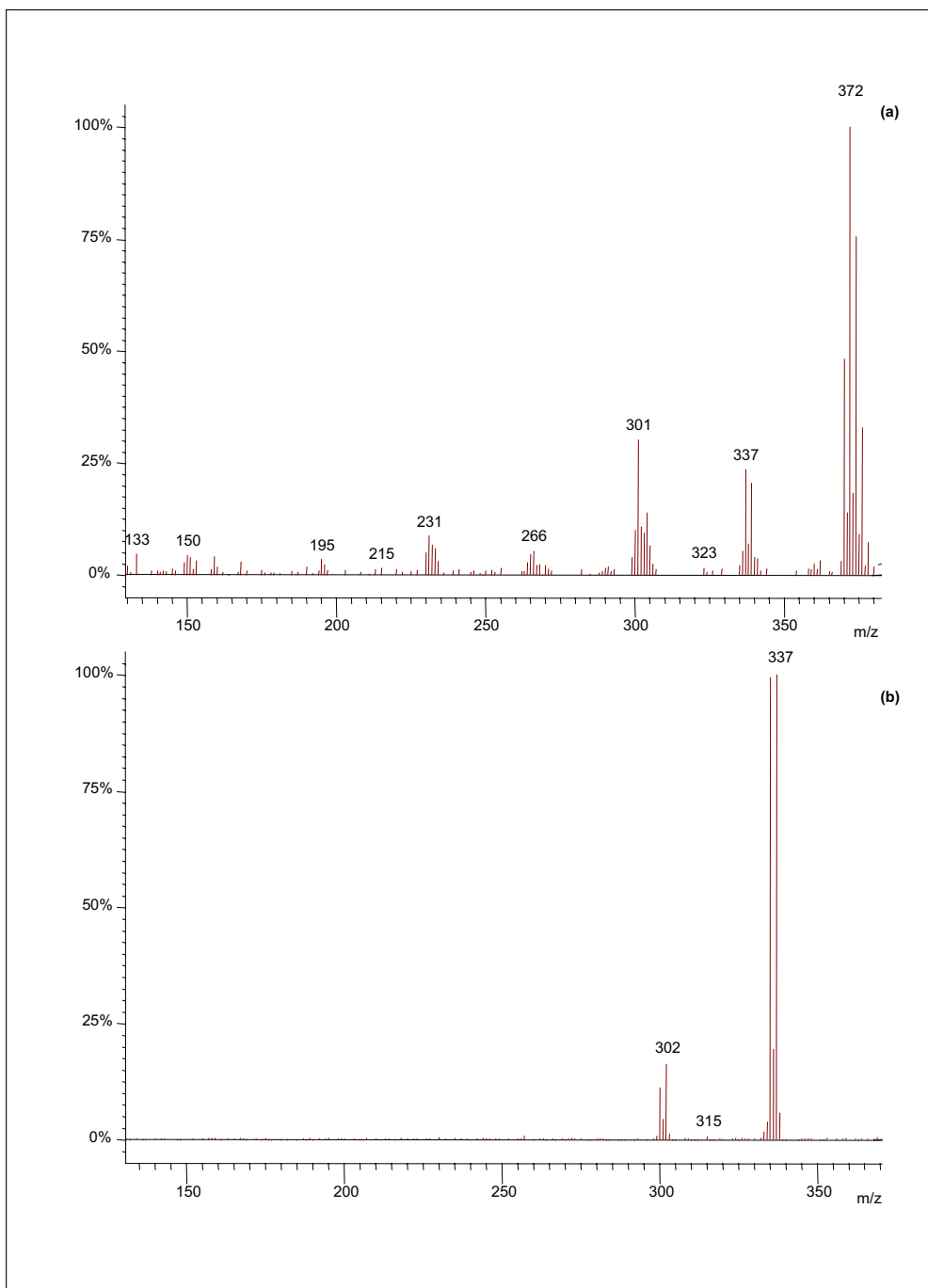


Figura A.II.15. Espectro del  $^{13}\text{C}$ -CB-153. (a) MS (EI); (b) MS/MS (EI).

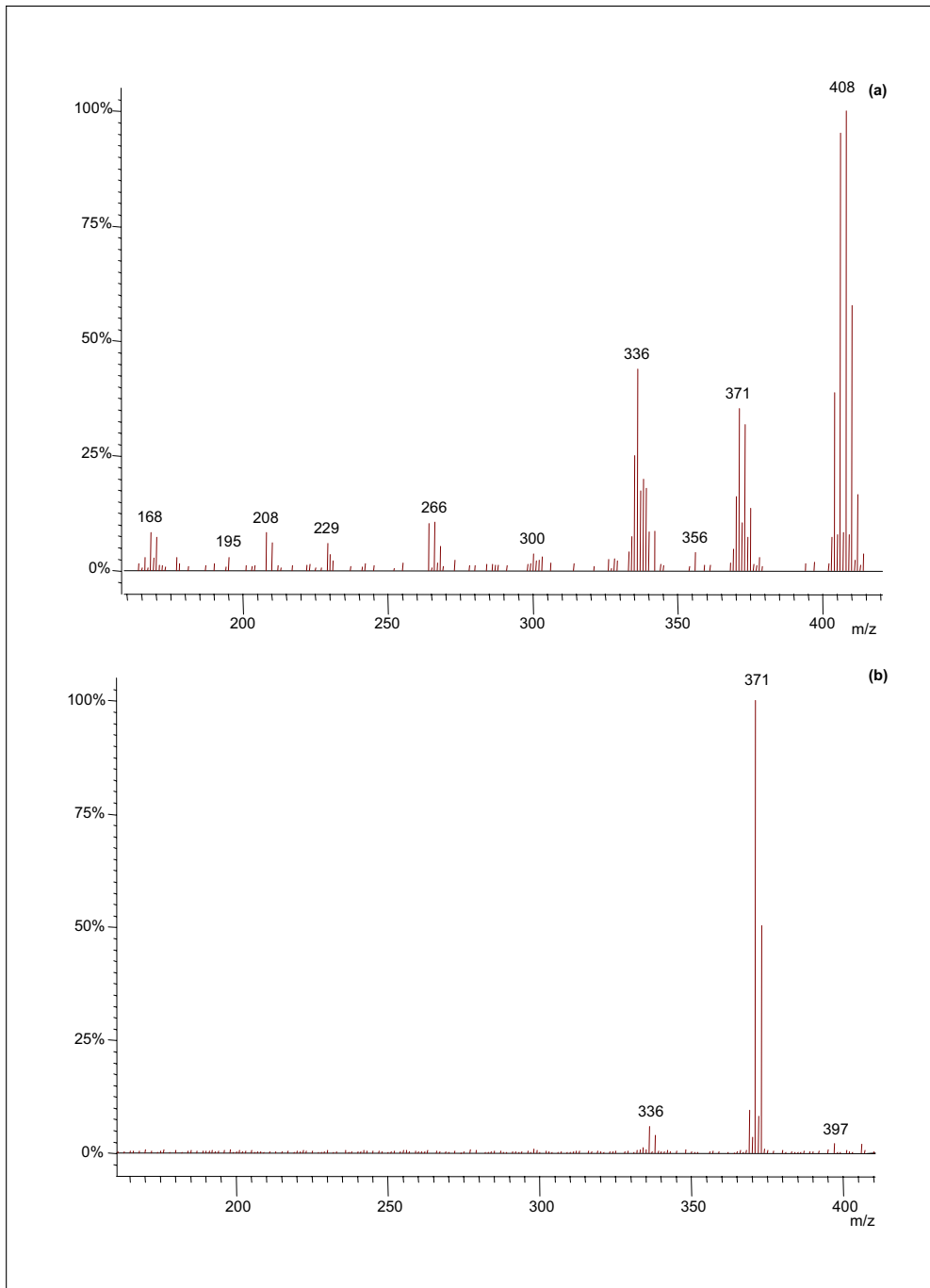


Figura A.II.16. Espectro del  $^{13}\text{C}$ -CB-180. (a) MS (EI); (b) MS/MS (EI).

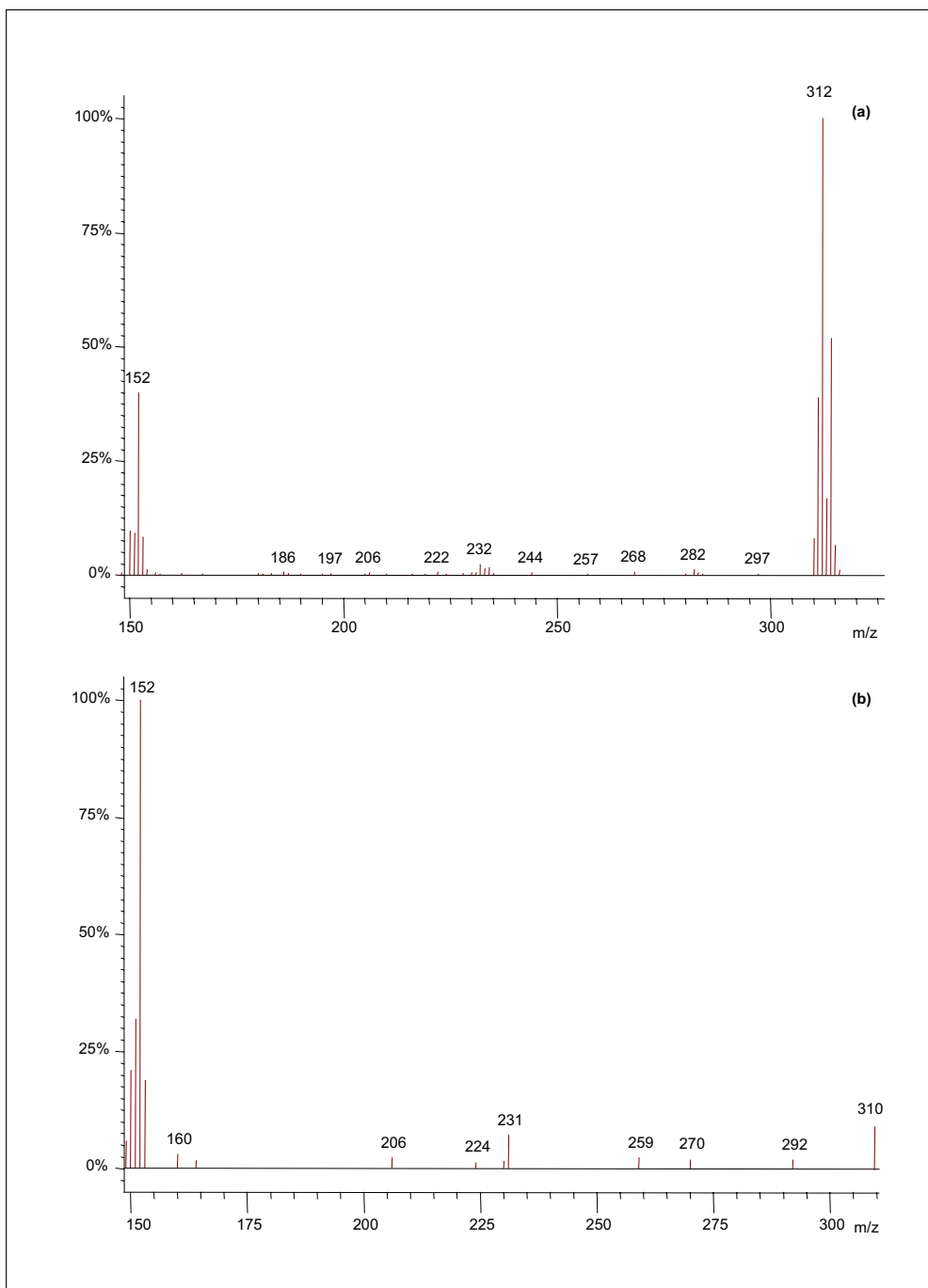


Figura A.II.17. Espectro del BB-15. (a) MS (EI); (b) MS/MS (EI).

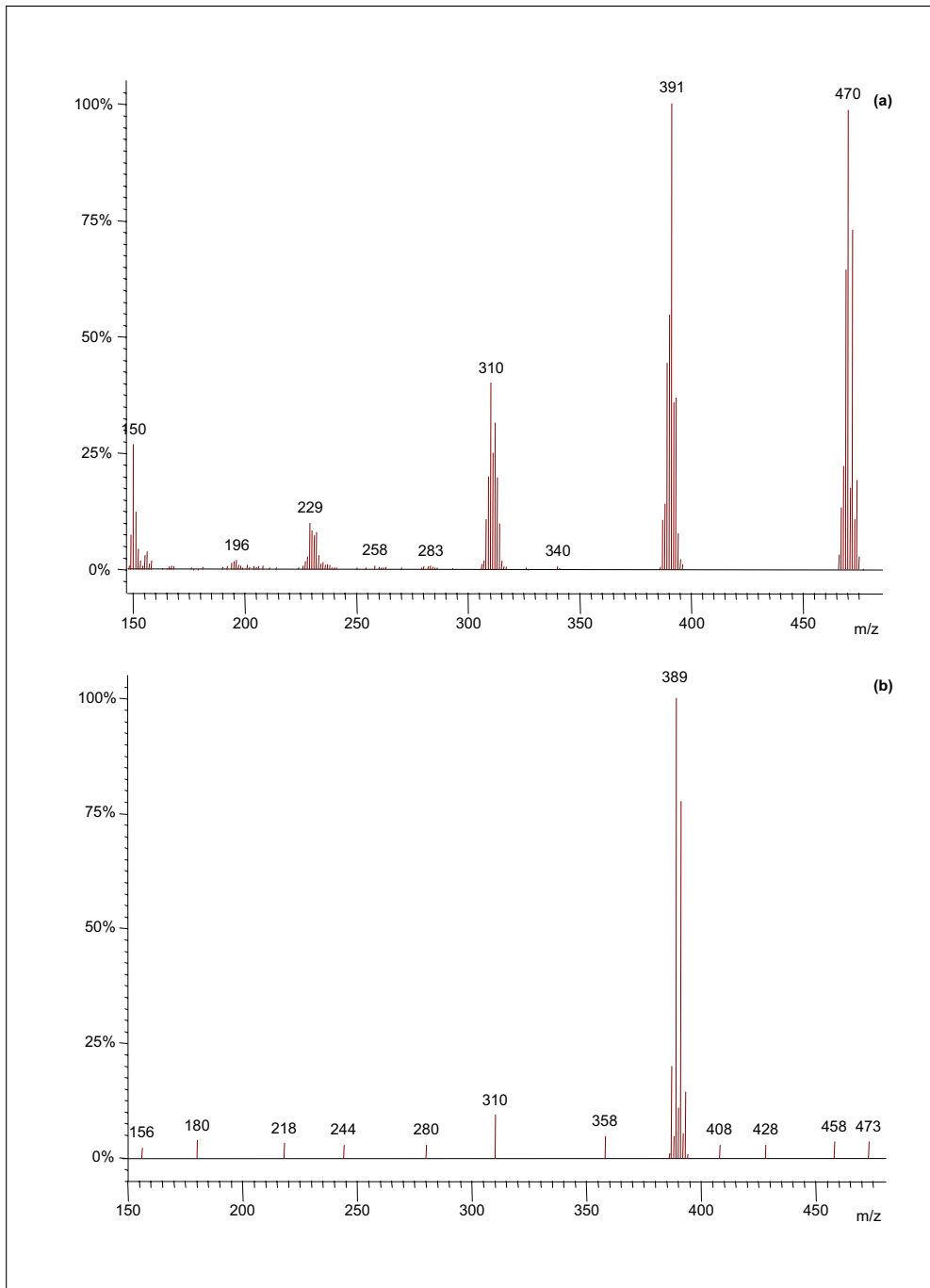


Figura A.II.18. Espectro del BB-49. (a) MS (EI); (b) MS/MS (EI).

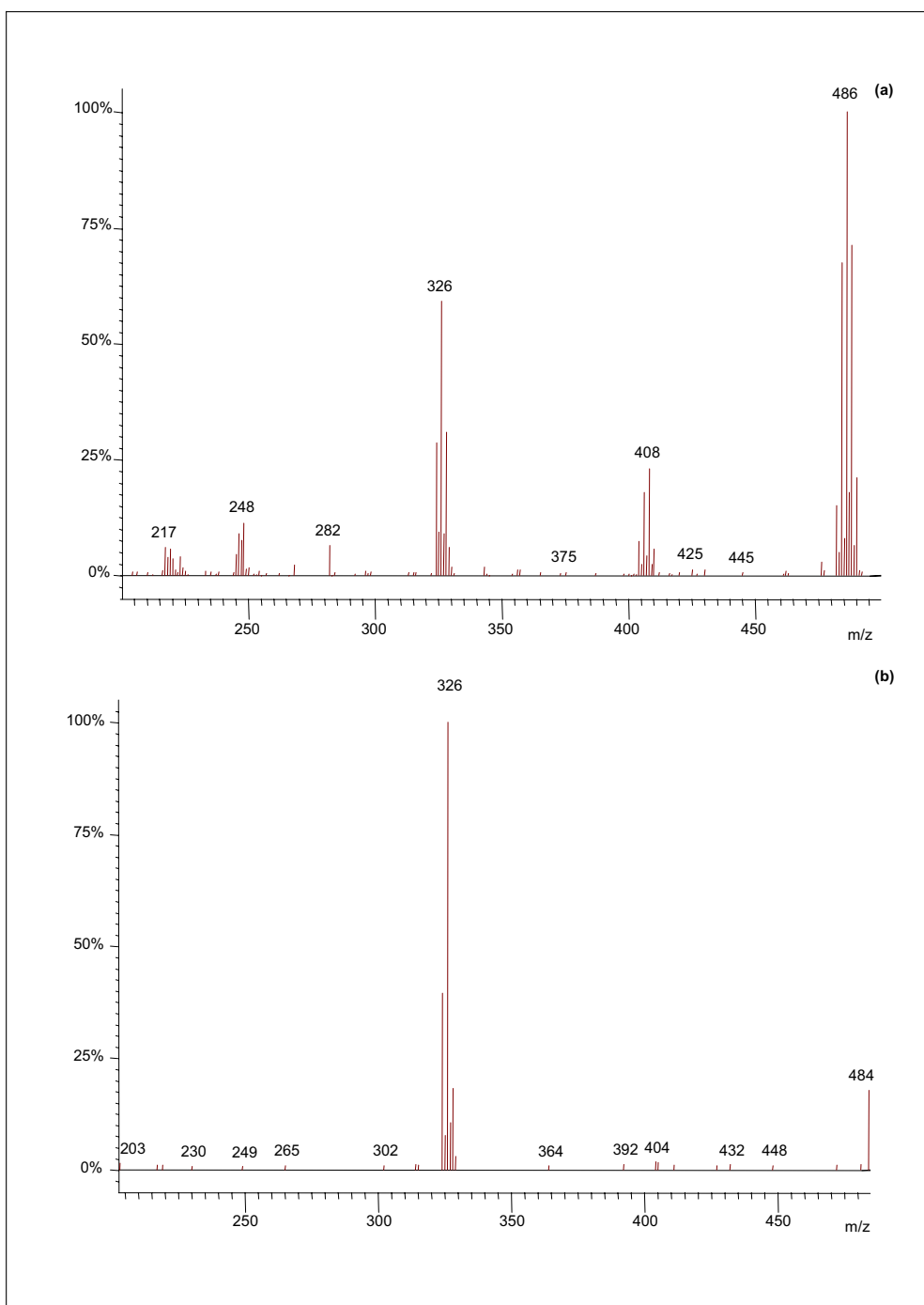


Figura A.II.19. Espectro del BDE-47. (a) MS (EI); (b) MS/MS (EI).

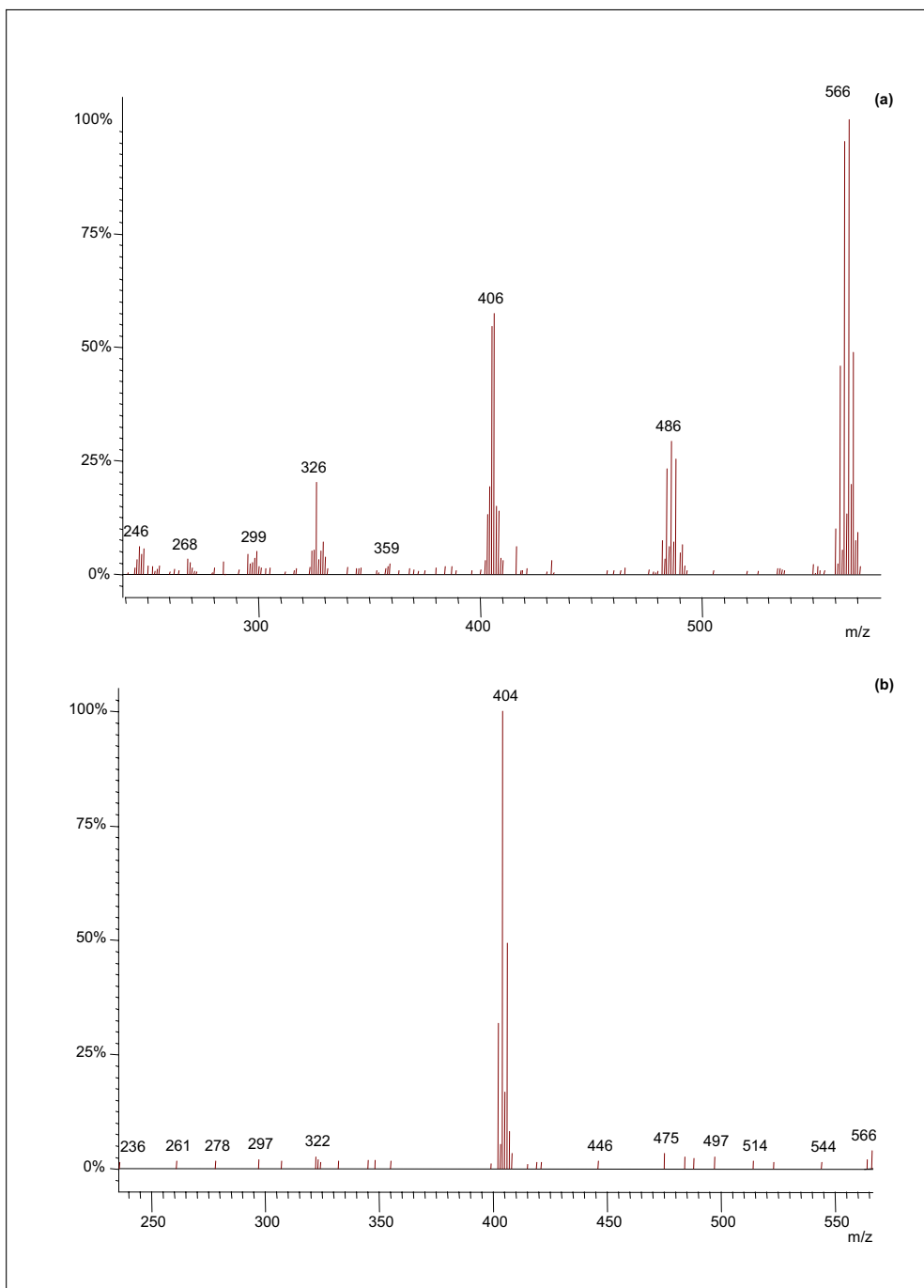


Figura A.II.20. Espectro del BDE-99. (a) MS (EI); (b) MS/MS (EI).



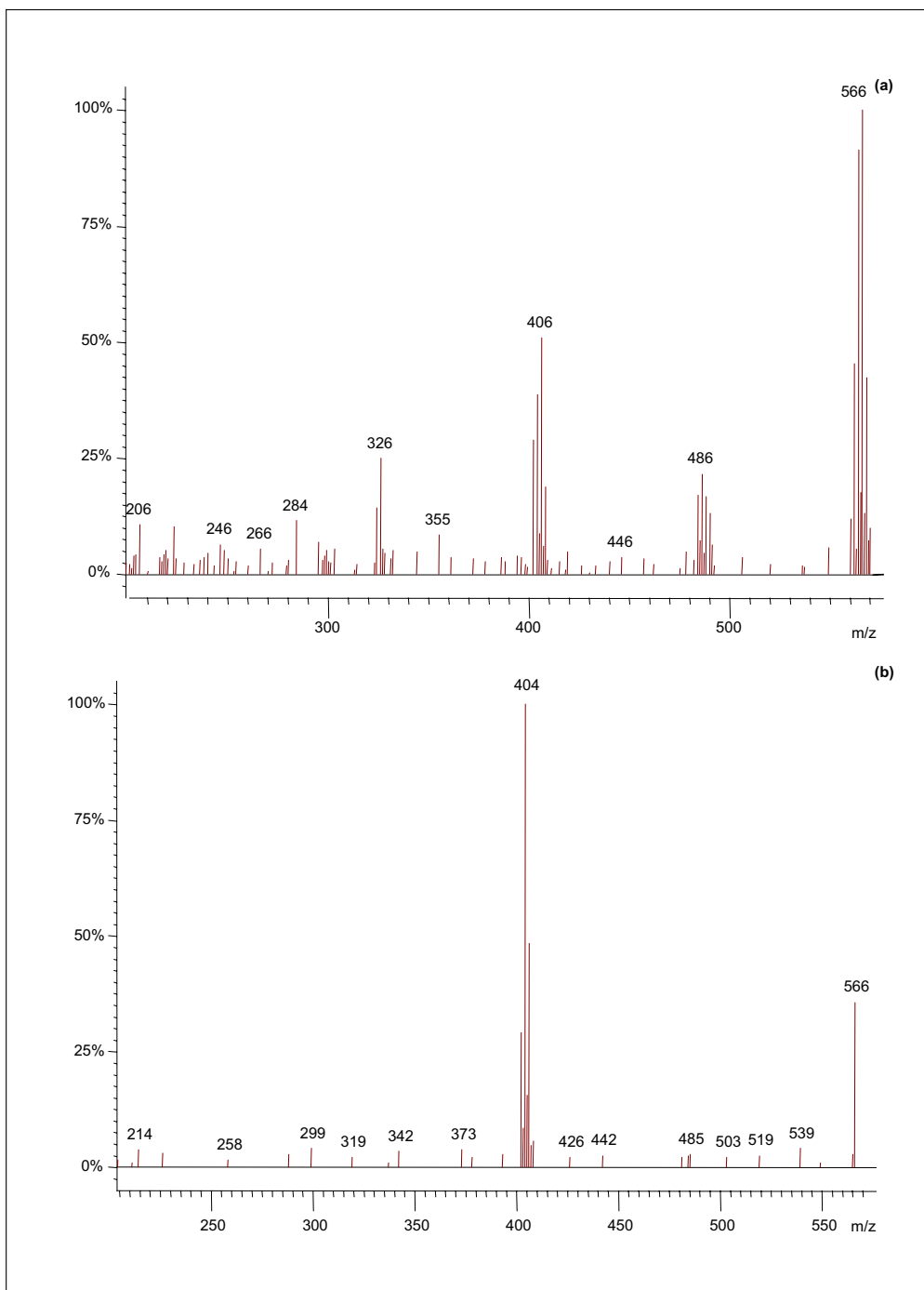


Figura A.II.21. Espectro del BDE-100. (a) MS (EI); (b) MS/MS (EI).



### **Alll.Acrónimos**



---

<b>AAS</b>	<i>Atomic Absorption Spectrometry</i>	Espectroscopia de Absorción Atómica
<b>ABS</b>	<i>Acrylonitrile Butadiene Styrene</i>	Estireno Butadieno Acrilonitrilo
<b>AC</b>	<i>Absorption Chromatography</i>	Cromatografía de Adsorción
<b>ACD</b>	<i>Advanced Chemistry Development</i>	
<b>ACP</b>	<i>Alternating Current Plasma</i>	Plasma de Corriente Alterna
<b>AED</b>	<i>Atomic Emission Detector</i>	Detector de Emisión Atómica
<b>AFS</b>	<i>Atomic Fluorescence Spectroscopy</i>	Espectroscopia de Fluorescencia Atómica
<b>AMD</b>	<i>Automated Methods Development</i>	Desarrollo de Métodos Automatizado
<b>APCI</b>	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionisation</i>	Ionización Química a Presión Atmosférica
<b>APDC</b>	<i>Ammonium Pyrrolidine Dithio Carbamate</i>	Ditiocarbamato Pirrolidin Amónico
<b>ASE</b>	<i>Accelerated Solvent Extraction</i>	Extracción con Disolventes Acelerada
<b>BCR</b>	<i>Bureau Communautaire de Référence</i>	
<b>BDP</b>	<i>Bisphenol A bi(Diphenyl Phosphate)</i>	Bisfenol A bi(Difenilfosfato)
<b>C-18</b>		Octadecilsilano
<b>CAR</b>	<i>Carboxen</i>	Carboxen
<b>CCP</b>	<i>Capacitively Coupled Plasma</i>	Plasma Acoplado Capacitivamente
<b>CE</b>	<i>Capillary Electrophoresis</i>	Electroforesis Capilar
<b>CI</b>	<i>Chemical Ionisation</i>	Ionización Química
<b>CRM</b>	<i>Certified Reference Material</i>	Material de Referencia Certificado

## ACRÓNIMOS

---

<b>CV</b>		Coeficiente de Variación
<b>CVAAS</b>	<i>Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry</i>	Espectroscopia de Absorción Atómica de Vapor Frío
<b>CVAFS</b>	<i>Cold Vapor Atomic Fluorescence Spectrometry</i>	Espectroscopia de Fluorescencia Atómica de Vapor Frío
<b>CW</b>	<i>Carbowax</i>	Carbowax
<b>DAPs</b>	<i>Di (Alkyl-/Aryl-) Phosphates</i>	Di (Alquil-/aril-) Fosfatos
<b>DBEP</b>	<i>Di(2-ButoxyEthyl) Phosphate</i>	Di (2-Butoxietil) Fosfato
<b>DBT</b>	<i>Di Butyl Tin</i>	Dibutilestaño
<b>DBzP</b>	<i>Di Benzyl Phosphate</i>	Dibenzilfosfato
<b>DCEP</b>	<i>Di (2-ChloroEthyl) Phosphate</i>	Di (2-Cloroetil)Fosfato
<b>DCM</b>	<i>DiChloroMethane</i>	Diclorometano
<b>DCP</b>	<i>Direct Current Plasma</i>	Plasma de Corriente Directa
<b>DCPP</b>	<i>Di (Chloro-2-Propyl) Phosphate</i>	Di (Cloro-2-Propil) Fosfato
<b>DDE</b>	<i>Dichloro Diphenyl Dichloroethene</i>	Dicloro difenil dicloroeteno
<b>DDT</b>	<i>Dichloro Diphenyl Trichloroethane</i>	Dicloro difenil tricloroetano
<b>DDTC</b>	<i>Diethyl Dithio Carbamate</i>	Dietil Ditio Carbamato
<b>DEHP</b>	<i>Di (2-Ethyl Hexyl) Phosphate</i>	Di (2-Etilhexil) Fosfato
<b>DiBP</b>	<i>Di (i-Butyl) Phosphate</i>	Di (i-Butil) Fosfato
<b>DnBP</b>	<i>Di (n-Butyl) Phosphate</i>	Di (n-Butil) Fosfato
<b>DOM</b>	<i>Dissolved Organic Matter</i>	Materia Orgánica Disuelta
<b>DPhP</b>	<i>Di Phenyl Phosphate</i>	Di Fenil Fosfato

---

DTC	<i>Dithio Carbamate</i>	Ditio Carbamato
DVB	<i>DiVynil Bencene</i>	Divinil Benceno
VP	<i>Vinyl Pyrrolidone</i>	Vinilpirrolidona
ECD	<i>Electron Capture Detector</i>	Detector de Captura Electrónica
ECNI	<i>Electron Capture Negative Ionization</i>	Ionización Química Negativa de Captura Electrónica
ED	<i>Endocrine Disruptor</i>	Disruptor Endócrino
EDTA	<i>Ethylene Diamine Tetraacetic Acid</i>	Ácido Etilen Diamino Tetraacético
EI	<i>Electron Impact</i>	Ionización mediante Impacto Electrónico
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoAssay</i>	Inmunoensayo Enzimático
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>	
EPC	<i>Electronic Pressure Control</i>	Control Electrónico de Presión
ESI	<i>ElectroSpray Ionisation</i>	Ionización mediante Electroesprai
ESy	<i>Extracting Syringe</i>	
ETAAS	<i>ElectroThermal Atomic Absorption Spectrometry</i>	Espectroscopia de Absorción Atómica de Vaporización Electrotérmica
EtHg		Etilmercurio
ETV	<i>ElectroThermal Vaporization</i>	Vaporización Electrotérmica
FAPES	<i>Furnace Atomization Plasma Emission Spectroscopy</i>	Espectroscopia de Emisión de Plasma en Cámara de Atomización
FDA	<i>Food And Drug Administration</i>	
FID	<i>Flame Ionization Detector</i>	Detector de Ionización en Llama

## ACRÓNIMOS

---

<b>FTIR</b>	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>	Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier
<b>GC</b>	<i>Gas Chromatography</i>	Cromatografía de Gases
<b>GCB</b>	<i>Graphitized Carbon Black</i>	Cartuchos de Carbón Grafitizado
<b>GD</b>	<i>Glow Discharge</i>	Plasma de Descarga Luminiscente
<b>GFAAS</b>	<i>Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i>	Espectroscopia de Absorción Atómica en Cámara de Grafito
<b>GPC</b>	<i>Gel Permeation Chromatography</i>	Cromatografía de Exclusión por Tamaños
<b>HAc</b>		Ácido Acético
<b>HBCD</b>	<i>HexaBromo CycloDecane</i>	Ciclodecano Hexabromado
<b>HCH</b>	<i>HexaChloro CycloHexane</i>	Hexacloro Ciclohexano
<b>Hg<sup>0</sup></b>		Mercurio Elemental
<b>HHPN</b>	<i>Hydraulic High Pressure Nebulization</i>	Nebulización Hidráulica a Alta Presión
<b>HPF</b>	<i>High Performance Flow</i>	Flujo de Alto Rendimiento
<b>HPLC</b>	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>	Cromatografía Líquida De Alta Resolución
<b>HS</b>	<i>HeadSpace</i>	Espacio de Cabeza
<b>IAEA</b>	<i>International Atomic Energy Agency</i>	
<b>ICP–AES</b>	<i>Inductively Coupled Plasma–Atomic Emission Spectrometry</i>	Plasma Acoplado Inductivamente–Espectrometría de Emisión Atómica
<b>ICP–MS</b>	<i>Inductively Coupled Plasma–Mass Spectrometry</i>	Plasma Acoplado Inductivamente–Espectrometría de Masas
<b>IP</b>	<i>Ion Pair</i>	Par Iónico



IS	<i>Internal Standard</i>	Patrón Interno
ITD	<i>Ion Trap Detector</i>	Detector de Atrapado de Iones
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>	
KBH <sub>4</sub>		Tetrahidroborato Potásico
LA	<i>Laser Ablation</i>	Ablación Láser
LC	<i>Liquid Chromatography</i>	Cromatografía Líquida
LD	<i>Lethal Dose</i>	Dosis Letal
LiFDDC	<i>Lithium Di(TrifluoroEthyl) Dithio Carbamate</i>	Di (Trifluoroetil) Ditio Carbamato de Litio
LLE	<i>Liquid-Liquid Extraction</i>	Extracción Líquido-Líquido
LOD	<i>Limit of Detection</i>	Límite de Detección
LOQ	<i>Limit of Quantification</i>	Límite de Cuantificación
LPME	<i>Liquid-Phase Micro Extraction</i>	Microextracción en Fase Líquida
MAE	<i>Microwave Assisted Extraction</i>	Extracción Asistida por Microondas
MBEP	<i>Mono (2-ButoxyEthyl) Phosphate</i>	Mono(2-ButoxiEtíl) Fosfato
MBT	<i>MonoButyl Tin</i>	Monobutil Estaño
MCPP	<i>Mono (Chloro-2-Propyl) Phosphate</i>	Mono (Cloro-2-Propil) Fosfato
Me <sub>2</sub> Hg		Dimetilmercurio
MeHg		Metilmercurio
MEHP	<i>Mono(2-EthylHexyl) Phosphate</i>	Mono (2-EtilHexil) Fosfato
MIBP	<i>Mono (i-Butyl) Phosphate</i>	Mono (i-Butil) Fosfato

## ACRÓNIMOS

---

<b>MnBP</b>	<i>Mono (n-Butyl) Phosphate</i>	Mono (n-Butil) Fosfato
<b>MIP</b>	<i>Molecularly Imprinted Polymer</i>	Polímero Impreso Molecularmente
<b>MIP-AES</b>	<i>Microwave Induced Plasma – Atomic Emission Spectrometry</i>	Plasma Inducido por Microondas– Espectrometría de Emisión Atómica
<b>MPhP</b>	<i>Mono Phenyl Phosphate</i>	Monofenil Fosfato
<b>MRLs</b>	<i>Maximum Residue Limits</i>	Límites Máximos
<b>MRM</b>	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>	Monitorización Múltiple de Reacciones
<b>MS</b>	<i>Mass Spectrometry</i>	Espectrometría de Masas
<b>MS-MS</b>	<i>Mass Spectrometry – Mass Spectrometry</i>	Espectrometría de Masas en Tándem
<b>MSPD</b>	<i>Matrix Solid Phase Dispersion</i>	Dispersión de la Matriz en Fase Sólida
<b>NaBEt<sub>4</sub></b>		Tetraetilborato Sódico
<b>NaBH<sub>4</sub></b>		Tetrahidroborato Sódico
<b>NaBPh<sub>4</sub></b>		Tetrafenilborato Sódico
<b>NaBPr<sub>4</sub></b>		Tetrapropilborato Sódico
<b>NCI</b>	<i>Negative Chemical Ionisation</i>	Ionización Química Negativa
<b>NPD</b>	<i>Nitrogen Phosphorus Detector</i>	Detector de Nitrógeno-Fósforo
<b>NRCC</b>	<i>National Research Council of Canada</i>	
<b>OAS</b>	<i>Optical Atomic Spectrometry</i>	Espectrometría de Emisión Óptica
<b>OCPs</b>	<i>OrganoChlorine Pesticides</i>	Plaguicidas Organoclorados
<b>ODS</b>	<i>OctaDecyl Silane</i>	Octadecilsilano
<b>PA</b>	<i>PolyAcrylate</i>	Poliacrilato

---

<b>PAHs</b>	<i>Polynuclear Aromatic Hydrocarbons</i>	Hidrocarburos Aromáticos Polinucleares
<b>PBBs</b>	<i>Polybrominated Biphenyls</i>	Bifenilos Polibromados
<b>PBDEs</b>	<i>Polybrominated Diphenyl Ethers</i>	Éteres de Difenilo Polibromados
<b>PCBs</b>	<i>Polychlorinated Biphenyls</i>	Bifenilos Policlorados
<b>PCDDs</b>	<i>Polychlorinated Dibenzo-p-Dioxins</i>	Dibenzo-p-Dioxinas Policloradas
<b>PCDFs</b>	<i>Polychlorinated Dibenzofurans</i>	Dibenzofuranos Policlorados
<b>PCI</b>	<i>Positive Chemical Ionisation</i>	Ionización Química Positiva
<b>PCO</b>	<i>Post Column Oxidation</i>	Oxidación Post Columna
<b>PDMS</b>	<i>Polydimethylsiloxane</i>	Polidimetilsiloxano
<b>PED</b>	<i>Plasma Emission Detector</i>	Detector de Emisión de Plasma
<b>PFE</b>	<i>Pressurised Fluid Extraction</i>	Extracción con Fluidos Presurizada
<b>PhHg</b>	<i>Phenylmercury</i>	Fenilmercurio
<b>PLE</b>	<i>Pressurised Liquid Extraction</i>	Extracción con Líquidos Presurizada
<b>POPs</b>	<i>Persistent Organic Pollutants</i>	Contaminantes Orgánicos Persistentes
<b>PS</b>	<i>Polystyrene</i>	Poliestireno
<b>PT</b>	<i>Purge and Trap</i>	Purga y Atrapado
<b>PTFE</b>	<i>Polytetrafluoroethylene</i>	Politetrafluoroetileno
<b>PVC</b>	<i>Polyvinylchloride</i>	Cloruro de Polivinilo
<b>RAM</b>	<i>Restrcted Access Material</i>	Material de Acceso Restringido
<b>RDP</b>	<i>Resorcinol Bi(Diphenyl Phosphate)</i>	Resorcinol Bi(Difenil Fosfato)

## ACRÓNIMOS

---

rf	<i>Radiofrequency</i>	Radiofrecuencias
HC	<i>Hollow Cathode</i>	Cátodo Hueco
RFP	<i>Radio Frequency Plasma</i>	Plasma Inducido por Radiofrecuencias
RIC	<i>Reconstructed Total Ion Chromatogram</i>	Cromatograma de Iones Totales Reconstruido
S/N	<i>Signal-To-Noise</i>	Relación Señal Ruído
SBSE	<i>Stir Bar Sorptive Extraction</i>	Extracción con Barra Adsorbente
SCF	<i>Sulfydryl Cotton Fiber</i>	Algodón con Grupos Sulfidriilo
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>	Dodecilsulfato Sódico
SFE	<i>Supercritical Fluid Extraction</i>	Extracción con Fluídos Supercríticos
SIDMS	<i>Speciated Isotope Dilution Mass Spectrometry</i>	Espectrometría de Masas por Dilución Isotópica de Especies
SIM	<i>Selected Ion Monitoring</i>	Monitorización de Iones Seleccionados
SLM	<i>Supported Liquid Membranes</i>	Membranas de Soporte Líquido
SOX	<i>Soxhlet Extraction</i>	Extracción Soxhlet
SPDC	<i>Sodium Pyrrolidine Dithio Carbamate</i>	Ditiocarbamato Pirrolidin Sódico
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>	Extracción en Fase Sólida
SPME	<i>Solid Phase Micro Extraction</i>	Microextracción en Fase Sólida
SS	<i>Solid Sampling</i>	Muestreo Sólido
SSC	<i>Strategic Sample Composition</i>	Composición Estratégica de Muestras
SSID	<i>Species- Specific Isotope Dilution</i>	Dilución Isotópica Específica Por Especies

<b>TAPs</b>	<i>Tri (Alkyl-/aryl-) Phosphates</i>	Tri (alquil-/aril-) Fosfatos
<b>TBBPA</b>	<i>Tetrabromobisphenol A</i>	Tetrabromobisfenol A
<b>TBEP</b>	<i>Tri(2-Butoxyethyl) Phosphate</i>	Tri (2-Butoxietil) Fosfato
<b>TIBP</b>	<i>Tri (i-Butyl) Phosphate</i>	Tri (i-butil) Fosfato
<b>TnBP</b>	<i>Tri (n-Butyl) Phosphate</i>	Tri (n-butil) Fosfato
<b>TBT</b>	<i>Tributyl Tin</i>	Tributil Estaño
<b>TCEP</b>	<i>Tri (2-Chloroethyl) Phosphate</i>	Tri (2-Cloroetil) Fosfato
<b>TCPP</b>	<i>Tri (1-Chloro-2-Propyl) Phosphate</i>	Tri (1-Cloro-2-Propil) Fosfato
<b>TDCP</b>	<i>Tri (1,3-Dichloro-2-Propyl)-Phosphate</i>	Tri (1,3-Dicloro-2-Propil) Fosfato
<b>TEHP</b>	<i>Tris (2-Ethylhexyl) Phosphate</i>	Tri (2-Etilhexil) Fosfato
<b>TIC</b>	<i>Total Ion Chromatogram</i>	Cromatograma De Iones Totales
<b>TMAH</b>	<i>Tetramethylammonium Hydroxide</i>	Hidróxido De Tetrametilamonio
<b>TOF</b>	<i>Time-Of-Flight</i>	Tiempo de Vuelo
<b>TPhP</b>	<i>Tri Phenyl Phosphate</i>	Tri Fenil Fosfato
<b>TPPO</b>	<i>Tri Phenylphosphine Oxyde</i>	Oxido de Trifenilfosfina
<b>TPrP</b>	<i>Tri Propyl Phosphate</i>	Tri Propil Fosfato
<b>TPT</b>	<i>Tripopyl Tin</i>	Tripopil Estaño
<b>TrBA</b>	<i>Tributyl Amine</i>	Tributilamina
<b>PTFE</b>	<i>Poly tetra fluoro ethylene</i>	Politetraflúoretileno
<b>USE</b>	<i>Ultrasound Assisted Extraction</i>	Extracción Asistida por Ultrasonidos
<b>UV</b>	<i>Ultraviolet</i>	Ultravioleta

*ACRÓNIMOS*

---

**WHO**    *World Health Organisation*

