



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
Facultad de Química
Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología
Instituto de Investigación y Análisis Alimentario (IIAA)

TESIS DOCTORAL

NUEVAS ESTRATEGIAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS E INHIBIDORES SELECTIVOS DE LA CICLOOXIGENASA-2 EN MUESTRAS MEDIOAMBIENTALES

Fdo: Sara Triñanes Romero

Memoria para optar al grado de Doctora en Química

Santiago de Compostela

Septiembre 2016



Dña. M^a Carmen Casais Laíño, Profesora Titular de Universidad del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela y **Dña. M^a Carmen Mejuto Martí**, Profesora Titular de Universidad del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela,

Como Directoras de la Tesis Doctoral titulada «Nuevas estrategias analíticas para la determinación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos e inhibidores selectivos de la Ciclooxygenasa-2 en muestras medioambientales» presentada por **Dña. Sara Triñanes Romero**, alumna del Programa de Doctorado en Ciencia y Tecnología Química (D1121V01),

AUTORIZAN la presentación de la Tesis indicada, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Artículo 34 del Reglamento de Estudios de Doctorado y que como Directoras de la misma no incurren en las causas de abstención establecidas en la Ley 30/1992.

Santiago de Compostela, a 16 de Septiembre de 2016

Fdo: M^a Carmen Casais Laíño

Fdo: M^a Carmen Mejuto Martí



Dña. M^a Carmen Casais Laíño, y **Dña. M^a Carmen Mejuto Martí**, como Directoras de la Tesis titulada «Nuevas estrategias analíticas para la determinación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos e inhibidores selectivos de la Ciclooxygenasa-2 en muestras medioambientales»,

Por la presente DECLARAN:

Que la Tesis presentada por **Dña. Sara Triñanes Romero** es idónea para ser presentada, de acuerdo con el Artículo 41 del Reglamento de Estudios de Doctorado de la Universidad de Santiago de Compostela, por la modalidad de COMPENDIO DE ARTÍCULOS, en los que el investigador en formación tuvo participación en el peso de la investigación y su contribución fue decisiva para llevar a cabo este trabajo.

Que los artículos que forman parte del trabajo de esta Tesis han sido realizados durante la etapa de estudios de doctorado y que han sido aceptados en revistas de reconocido impacto internacional con revisión anónima por pares, de acuerdo con el Artículo 41 del presente Reglamento.

Que está en conocimiento de los coautores, tanto doctores como no doctores, participantes en los artículos, que ninguno de los trabajos reunidos en esta Tesis será presentado por ninguno de ellos en otra Tesis Doctoral, lo que firmamos bajo nuestra responsabilidad.

Santiago de Compostela, a 16 de Septiembre de 2016

Fdo: M^a Carmen Casais Laíño

Fdo: M^a Carmen Mejuto Martí



Agradecementos

A piques de rematar unha das etapas máis longa e máis intensa, sinto a necesidade de expresar a gratitude a todas e cada unha das persoas que, de un xeito ou outro, me aportaron tantas cousas positivas e me fixeron medrar a nivel persoal e profesional.

En primeiro lugar, gustaríame agradecer ás miñas directoras, Carmela e Mamen, por permitirme coñecer este “mundo da investigación” que ás veces semella complicado, pero co apoio e a formación que me brindaron xunto coa paciencia e familiaridade coa que sempre me trataron, fíxose unha viaxe interesante e de proveito.

Outra das persoas á que me gustaría adicarlle unhas palabras de agradecemento é o director deste grupo, Rafael. Grazas polos bos consellos, polo apoio e comprensión recibido. E como non, grazas por facerme ver que ata a Quimiometría pode ser divertida se se atopa á persoa que a ensina con tanta pasión e bo facer coma ti.

Grazas a todo o grupo de investigación polo ben que me trataron todos estes anos e a confianza que depositaron en min. En especial a Charo e Tito por abrirme as portas e permitirme coñecer todo o bo que se pode atopar no IIAA. E non me esquezo de Isaac, que a pesares de non ter obriga para comigo; estivo sempre que o necesitei para axudarme.

Así mesmo, agradecer á Xunta de Galicia a través do proxecto GRC2013/020, ó Ministerio de Economía e Competitividade a través dos proxectos CTQ2012-33080 e CTQ2015-68660-P o financiamento recibido e a Mestrelab que colaborou de igual maneira para o desenvolvemento desta Tese.

Unha das mellores etapas vividas foi no IIAA e en gran medida foi á xente coa que compartín experiencias únicas. Cabe dicir, que non só foron compañeiros senón que se trocaron para min nunha gran familia, na que as risas e os bos momentos foron sempre o denominador común de todos. Grazas rapaces: Tamara, Inés, Jorge, Josu, Beni, Gabi, Rosa, Iria, Inma.... Todos e cada un de vós deixates unha pegada especial en min.

Tampouco me esquezo das amizades feitas na carreira: Alba, María, Andrea, Mara, Iria...Témolo pasado ben xuntas e foi un pracer tervos coñecido. Por suposto, tamén lle dedico unhas palabras de agradecemento ás amigas de toda a vida, as da

“Tropa”. Xa son moitos anos, con algunhas coincidín dende ben pequena e con outras non tanto, pero a todas as quero por igual e a todas lles desexo o mellor porque sempre están cando as necesito e cando non tamén, jeje!!!

A toda a miña familia, en especial a meus pais que nunca deixaron de apoiarme e crer en min. Por todos os seus consellos, o seu cariño e comprensión ó longo de toda a vida. Son moi afortunada de tervos e sempre seredes a miña guía e exemplo a seguir.

E finalmente a Esteban, grazas por ensinarme que o mellor regalo da vida é compartila e aproveitala coa persoa que sempre me quita un sorriso, coa que me apoia e confía en min. Grazas por ser paciente, por escoitarme e axudarme. Grazas por ser ti.





A mis padres





ÍNDICE



I. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	1
II. INTRODUCCIÓN	9
1. HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS.....	11
1.1. Definición, propiedades y estructura.....	11
1.2. SÍNTESIS.....	17
1.2.1. Formación de PAHs	17
1.2.2. Factores de emisión	19
1.3. TOXICIDAD.....	22
1.3.1. Efectos sobre la salud humana	22
1.3.1.1. Vías de exposición	24
1.3.1.2. Metabolismo.....	25
1.3.2. Productos de fotorreacción	26
1.3.2.1. Formación de nitro-PAHs	27
1.3.2.2. Formación de quinonas	29
1.3.2.3. Formación de PAHs halogenados	29
1.4. DISTRIBUCIÓN DE LOS PAHs EN EL MEDIO AMBIENTE.....	30
1.4.1. Presencia de PAHs en aire.....	32
1.4.2. Presencia de PAHs en suelos y lodos	33
1.4.3. Presencia de PAHs en aguas.....	36
1.5. ELIMINACION DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS.....	37

1.5.1. Biodegradación.....	37
1.5.2. Procesos convencionales	38
1.5.2.1. Ozonización	38
1.5.2.2. Fotólisis directa.....	39
1.5.3. Procesos de oxidación avanzada.....	40
1.6. LEGISLACIÓN	41
1.6.1. Normativa de los PAHs en el medio ambiente	41
2. INHIBIDORES SELECTIVOS DE LA CICLOOXIGENASA-2 (COXIBs).....	47
2.1. Definición, propiedades y estructura	47
2.2. SÍNTESIS.....	52
2.2.1. Anti-inflamatorios no esteroideos modificados	52
2.3. MECANISMO DE ACCIÓN.....	52
2.3.1. Metabolismo	53
2.4. CONSUMO	59
2.5. ANTI-INFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS EN EL MEDIO AMBIENTE	63
II.A.PREPARACIÓN DE MUESTRA.....	67
3. PREPARACIÓN DE MUESTRA: TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN PARA LOS ANALITOS ESTUDIADOS	69
3.1. Muestras líquidas	69
3.1.1. Extracción en fase sólida	70

3.1.1.1. Adsorbentes.....	72
3.1.1.2. Formatos y dispositivos comerciales.....	75
3.1.1.3. Aplicación de la SPE en la determinación de Coxibs en muestras acuosas	78
3.1.2. Extracción mediante absorción sobre barras agitadoras.....	81
3.1.2.1. Teoría de la SBSE	83
3.1.2.2. Factores que afectan a la SBSE.....	84
3.1.2.3. Extracción con polímeros Ad/adsorbentes de bajo coste.....	86
3.1.2.4. Aplicación de la SBSE a la extracción de PAHs en matrices acuosas.....	87
3.2. Muestras sólidas.....	91
3.2.1. Dispersión de matriz en fase sólida	93
3.2.1.1. Etapas de la MSPD.....	94
3.2.1.2. Parámetros que influyen en el proceso de extracción mediante MSPD	95
3.2.1.3. Aplicaciones de la MSPD para la determinación de COXIBs	96
II.B.TÉCNICAS DE DETERMINACIÓN	99
4. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN	101
4.1. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA.....	101
4.1.1. Sistemas de detección.....	101
4.1.1.2. Detectores de absorbanza Ultravioleta-Visible.....	101
4.1.1.3. Detectores de espectrometría de fluorescencia molecular	102

4.1.1.4. Detectores de espectrometría de masas	104
4.1.2. Aplicación de HPLC/UPLC-FLD/UV para la determinación de PAHs.....	110
4.1.3 Aplicación de LC-MS/MS para la determinación de Coxibs	111
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	145
PUBLICACIÓN III.1	150
<u>DEVELOPMENT OF A NEW SORPTIVE EXTRACTION METHOD BASED ON</u> <u>SIMULTANEOUS DIRECT AND HEADSPACE SAMPLING MODE FOR THE SCREENING</u> <u>OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN WATER SAMPLES</u>	101
PUBLICACIÓN III.2	185
<u>SELECTIVE DETERMINATION OF COXIBS IN ENVIRONMENTAL WATER SAMPLES BY</u> <u>MIXED-MODE SOLID PHASE EXTRACTION AND LIQUID CHROMATOGRAPHY</u> <u>QUADRUPOLE TIME-OF-FLIGHT MASS</u>	186
PUBLICACIÓN III.3	213
<u>MATRIX SOLID-PHASE DISPERSION FOLLOWED BY LIQUID CHROMATOGRAPHY</u> <u>TANDEM MASS SPECTROMETRY FOR THE DETERMINATION OF SELECTIVE</u> <u>CYCLOOXYGENASE-2-2 INHIBITORS IN SEWAGE SLUDGE SAMPLES</u>	214
IV. CONCLUSIONES GENERALES	243
SIGLAS Y ACRÓNIMOS	249
ANEXOS.....	255







I. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



En las últimas seis décadas la gestión insostenible de productos químicos tóxicos a través de su ciclo de vida ha dado lugar a una contaminación generalizada y masiva del medio ambiente, la biota y los seres humanos. Entre dichos productos se encuentran los contaminantes orgánicos persistentes (*persistent organic pollutants, POPs*). Los POPs son considerados un grave problema a nivel mundial debido a su persistencia, la transportabilidad de largo alcance, su capacidad para acumularse en los tejidos grasos y su elevada toxicidad incluso a bajas concentraciones [1]. Debido a esta serie de amenazas importantes que afectan gravemente a la salud humana y al medio ambiente, en el año 2001 los gobiernos mundiales se reunieron en Suecia para adoptar un tratado internacional destinado a restringir, reducir y con el tiempo eliminar dichos compuestos. El Convenio se conoce como **Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes** y entró en vigor en mayo de 2004. Entre estos contaminantes se incluyen plaguicidas como la aldrina, atrazina o DDT, algunos productos industriales como son los bifenilos policlorados y otros como las dioxinas o los furanos.

Otra serie de contaminantes que ha suscitado gran atención e importancia son los denominados contaminantes emergentes, entre los que se incluyen compuestos farmacéuticos y drogas de abuso, que actualmente no disponen de ningún tipo de regulación, pudiendo en un futuro disponer de ella dependiendo de las investigaciones sobre sus efectos potenciales en la salud y los datos de monitorización con respecto a su incidencia.

En la presente Tesis Doctoral se ha abordado el estudio de dos familias específicas:

A. Contaminantes Orgánicos Persistentes: Hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Desde el punto de vista histórico es importante señalar que fueron los primeros agentes químicos en ser reconocidos como causantes de tumores malignos en los seres humanos. Estos contaminantes son conocidos por su persistencia en el medioambiente, bioacumulación y sus efectos negativos en humanos y animales debido a su toxicidad, carcinogeneidad, mutageneidad y su actividad como disruptores endocrinos [2-4].

Dentro de este apartado se estudiarán 24 analitos, de los cuales 16 se encuentran designados por la Agencia de Protección Medioambiental (*Environmental Protection Agency, EPA*) como contaminantes prioritarios. La técnica empleada para la extracción de los analitos en matrices acuosas fue la microextracción en fase sólida empleando como fase extractante material polimérico de bajo coste, el Polidimetilsiloxano (*Polydimethylsiloxane, PDMS*). La herramienta analítica empleada para la determinación de estos compuestos fue la cromatografía líquida de ultra eficacia (*ultra-performance liquid chromatography, UPLC*) acoplada a detección ultravioleta (*ultraviolet, UV*) y fluorescencia (*fluorescence, FD*).

B. Contaminantes emergentes: Inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa 2.

Este tipo de compuestos pertenecen al grupo de anti-inflamatorios no esteroideos (*non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs*). En la última década en España, su consumo ha ido incrementándose moderadamente, aunque para algunos de ellos, como el Rofecoxib su retirada del mercado se vio obligada por motivos de seguridad [5]. La gran mayoría de estos contaminantes se introducen en el medio ambiente, después de su consumo mediante la excreción de forma inalterada de dichos compuestos o de sus metabolitos, siendo fácilmente incorporados a las redes de las plantas de tratamiento de aguas residuales (*wastewater treatment plants, WWTPs*) no siendo éstas capaces de eliminarlos por completo [6]. La mayoría de los estudios se centran en aguas residuales (influyente y efluente), pero el material resultante de las WWTPs conocido como lodo o biosólido, es otra de las matrices a tener en cuenta ya que a menudo tiene aplicaciones en la agricultura como fertilizante [7].

En esta familia de compuestos se han estudiado 6 COXIBs en muestras ambientales que se corresponden con aguas residuales y con lodos de depuradora. Debido a la carencia de metodologías actualmente, se propondrá la extracción en fase sólida (*solid phase extraction, SPE*) como técnica de extracción y la determinación se hará mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas híbrida de tipo cuadrupolo tiempo de vuelo (*liquid*

chromatography coupled to hibryd mass spectrometry quadrupole time-of-fly, LC-QTOF/MS) para muestras acuosas y la técnica de dispersión de la matriz en fase sólida (*matrix solid phase disperssion, MSPD*) para muestras sólidas empleando como técnica de determinación LC-QTOF/MS.

Por tanto los objetivos generales de este trabajo para ambas familias se pueden resumir a continuación:

- Desarrollo de una metodología sensible, selectiva, eficiente y robusta para la determinación de los compuestos de interés en las diferentes matrices medioambientales, ya sean aguas residuales como influente y efluente, aguas superficiales (ríos) o bien lodos.
- Caracterización y validación de la metodología propuesta para su posterior aplicación a diferentes matrices medioambientales.
- Búsqueda no dirigida de otros contaminantes emergentes en las muestras medioambientales.



REFERENCIAS

- [1] A. Pariatamby, Y.L. Kee, *Persistent Organic Pollutants Management and Remediation*, Procedia Environmental Sciences 31 (2016) 842-848.
- [2] A. Limam, T.P.N. Talorete, M. Ben Sik Ali, M. Kawano, A. Jenhani Ben Rejab, Y. Abe, A. Ghrabi, H. Isoda, *Assessment of estrogenic activity in Tunisian water and wastewater by E-Screen assay*, Environmental Science 14 (2007) 43-52.
- [3] W. Mnif, S. Dagnino, A. Escande, A. Pillon, H. Fenet, E. Gomez, C. Casellas, M.J. Duchesne, G. Hernandez-Raquet, V. Cavaillès, P. Balaguer, A. Bartegi, *Biological analysis of endocrine-disrupting compounds in Tunisian sewage treatment plants*, Archives of Environmental Contamination and Toxicology 59 (2010) 1-12.
- [4] Y.F. Jiang, X.T. Wang, M.H. Wu, G.Y. Sheng, J.M. Fu, *Contamination, source identification, and risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in agricultural soil of Shanghai, China*, Environmental Monitoring Assessment 183 (2011) 139-150.
- [5] Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (Web). Septiembre 2004. Nota informativa Suspensión de comercialización de rofecoxib. Ref. 2004/10. Disponible en:
http://www.aemps.gob.es/informa/notasInformativas/medicamentosUsoHumano/seguridad/2004/NI_2004-10_rofecoxib.htm. (Enlace revisado el 21 de enero de 2014).
- [6] J. Malmborg, J. Mágner, *Pharmaceutical residues in sewage sludge: effect of sanitization and anaerobic digestion*, Journal of Environmental Management 153 (2015) 1-10.
- [7] P. Herrero, F. Borrull, E. Pocurull, R.M. Marcé, *A quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction method followed by liquid chromatography-(Orbitrap) high resolution mass spectrometry to determine benzotriazole, benzothiazole and benzene sulfonamide derivates in sewage sludge*, Journal of Chromatography A 1339 (2014) 34-41.





II. INTRODUCCIÓN

1. HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

1.1. Definición, propiedades y estructura

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (*polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs*) son un grupo de compuestos orgánicos formados por átomos de carbono e hidrógeno que se configuran en estructuras aromáticas con dos o más anillos fusionados, pudiendo existir en varias posiciones isoméricas, constituyendo así una familia de más de 100 compuestos orgánicos diferentes [1]. Generalmente, estos compuestos se clasifican como no-alternantes si su estructura está compuesta únicamente por anillos bencénicos fusionados, o alternantes si por el contrario muestran anillos no aromáticos de cuatro, cinco o seis átomos en su estructura [2]. También es importante acentuar la formación de otros PAHs derivados que contienen en sus estructuras otros grupos funcionales (nitro, halo, hidroxilo, etc) [3].

Los PAHs son compuestos sólidos en condiciones ambientales, incoloros o con una tonalidad blanca o amarilla pálida [4]. Se tratan de moléculas poco polares, mostrando una naturaleza altamente lipofílica, disminuyendo su polaridad y aumentando su estabilidad electroquímica a medida que aumenta su angularidad y el número de anillos aromáticos [5]. Los PAHs de bajo peso molecular (aquellos que constan de 2 ó 3 anillos aromáticos) suelen ser altamente tóxicos mientras que aquellos que presentan alto peso molecular (4 o más anillos aromáticos) son altamente cancerígenos y mutágenos [6]. Los PAHs fueron, tal vez, los primeros carcinógenos ambientales reconocidos, siendo difícilmente degradables en condiciones naturales (presentan resistencia a la biodegradación).

Los PAHs pertenecen al grupo de contaminantes orgánicos persistentes (*persistent organic pollutants, POPs*) ya que en conformidad con el protocolo de Contaminantes Orgánicos Persistentes firmado el 24 de junio de 1998 en Dinamarca, recogen las 5 características principales: (1) ser tóxicos, (2) persistentes, (3) bioacumulables, (4) ser transportados a través del aire y depositados a largas distancias y (5) causar efectos negativos sobre la salud y el medio ambiente, tanto cerca como lejos de su fuente de emisión [7].

En la **Figura II.1** se muestra la estructura de algunos PAHs. Entre ellos se encuentran los 16 designados por la Agencia de Protección Ambiental (*Environmental*

Protection Agency, EPA) y por la Comunidad Europea (*European Community, EC*) como contaminantes ambientales prioritarios.



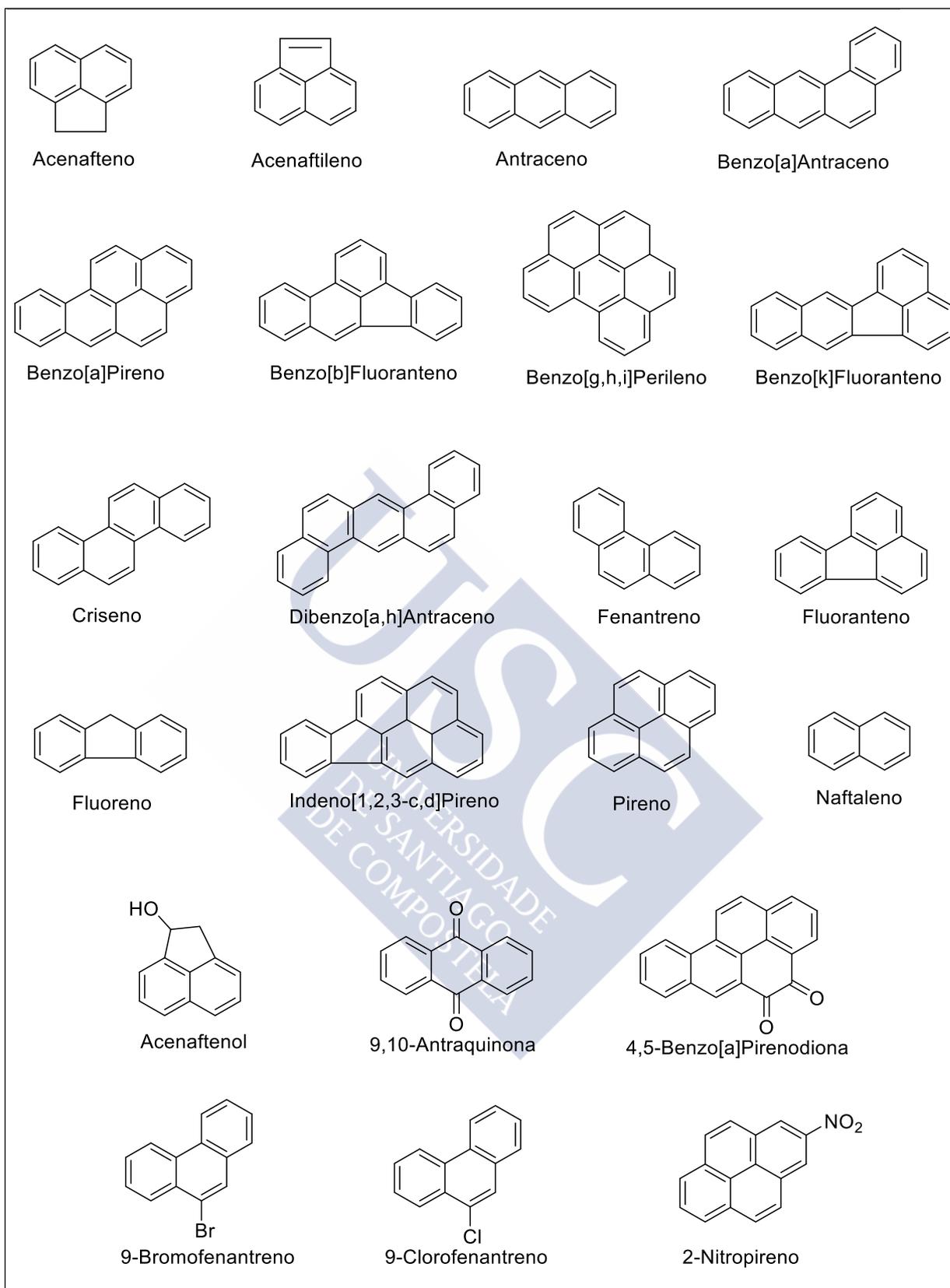


Figura II.1. Estructura molecular de algunos PAHs de interés.

- **Propiedades espectroscópicas**

Es importante señalar su inestabilidad fotoquímica. Los PAHs absorben luz en la región ultravioleta A (UVA) (entre 320 a 400 nm). PAHs con 5 o más anillos aromáticos pueden absorber en el visible ($> 400\text{nm}$) [8]. Los productos de fotorreacción de los PAHs, incluyendo, los nitro-PAHs, halogenados, oxigenados y las quinonas, pueden asimismo absorber energía lumínica y volver a reaccionar ejerciendo fototoxicidad [9].

- **Absorción**

Los PAHs poseen espectros de absorción ultravioleta característicos [10]. Estos espectros surgen de transiciones electrónicas. La intensidad de estas transiciones y su energía vienen determinadas por los anillos aromáticos de la molécula. La sustitución de los anillos aromáticos genera un desplazamiento batocrómico, generalmente por grupos alquilo.

- **Fluorescencia**

La fluorescencia de los hidrocarburos aromáticos policíclicos está estrechamente relacionada con la presencia de orbitales π -enlazantes de alta energía y orbitales π -antienlazantes de menor energía. La transición que tiene lugar entre ambos tipos de orbitales es la responsable de originar el color y los espectros característicos de absorción ultravioleta y de fluorescencia.

- **Fosforescencia**

En cuanto a las propiedades fosforescentes, casi todos los PAHs las presentan. Debido a que se producen procesos de desactivación de los estados tripletes de las moléculas, no se pueden detectar fosforescencia en muestras líquidas a temperatura ambiente.

En la **Tabla II.1** se recogen las **propiedades físico-químicas** de algunos PAHs, las cuales vienen determinadas por los sistemas electrónicos π -conjugados. La solubilidad de los mismos depende de la temperatura, pH, fuerza iónica y los componentes que se puedan hallar en la matriz acuosa (por ejemplo, la cantidad de carbono orgánico

disuelto). No obstante, los PAHs tienen relativa baja solubilidad en agua, pero se disuelven fácilmente en grasas y aceites con tendencia a acumularse en los tejidos adiposos de organismos vivos. Los PAHs exhiben presiones de vapor variables, los que presentan bajos valores se encuentran asociados con partículas sólidas de suelos y sedimentos, mientras que los que tienen altas presiones de vapor se hallan en fase vapor a temperatura ambiente en el aire. Además, la volatilidad disminuye a medida que el número de anillos aromáticos aumenta.



Tabla II.1. Propiedades físico-químicas de los 24 PAHs estudiados.

Compuesto	Nº CAS	Fórmula molecular	Peso molecular (uma)	Punto de ebullición (°C)	log K _{ow}	Pv (kPa)
Naftaleno (NAFT)	91-20-3	C ₁₀ H ₈	128	218	3.36	1.04×10 ⁻⁰²
Acenaftileno (ACY)	208-96-8	C ₁₂ H ₈	152	280	4.07	8.9×10 ⁻⁰⁴
Acenafteno (ACE)	83-32-9	C ₁₂ H ₁₀	154	279	3.92	2.9×10 ⁻⁰⁴
Fluoreno (FLU)	86-73-7	C ₁₃ H ₁₀	166	298	4.18	9.0×10 ⁻⁰⁵
Fenantreno (FEN)	85-01-8	C ₁₄ H ₁₀	178	340	4.57	1.6×10 ⁻⁰⁵
Antraceno (ANT)	120-11-7	C ₁₄ H ₁₀	178	340	4.54	8.0×10 ⁻⁰⁷
Fluoranteno (FLUOR)	206-44-0	C ₁₆ H ₁₀	202	384	5.22	1.2×10 ⁻⁰⁶
Pireno (PIR)	190-00-0	C ₁₆ H ₁₀	202	404	5.18	6.0×10 ⁻⁰⁷
Ciclopenta[c,d]Pireno (CP[c,d]P)	27208-37-3	C ₁₈ H ₁₀	226	N.D	4.90	-
Benzo[a]Antraceno (B[a]A)	56-55-3	C ₁₈ H ₁₂	228	438	5.61	2.8×10 ⁻⁰⁸
Criseno (CRIS)	218-01-9	C ₁₈ H ₁₂	228	448	5.91	8.4×10 ⁻⁰⁸
5-Metilcriseno (5-MCRIS)	3697-24-3	C ₁₉ H ₁₄	242	458	4.62	-
Benzo[j]Fluoranteno (B[j]F)	205-82-3	C ₂₀ H ₁₂	252	N.D	6.18	1.8×10 ⁻⁰⁸
Benzo[b]Fluoranteno (B[b]F)	205-99-2	C ₂₀ H ₁₂	252	481	6.12	6.7×10 ⁻⁰⁸ (a)
Benzo[k]Fluoranteno (B[k]F)	207-08-9	C ₂₀ H ₁₂	252	480	6.84	1.3×10 ⁻¹¹ (a)
Benzo[a]Pireno (B[a]P)	50-32-8	C ₂₀ H ₁₂	252	495	6.50	7.3×10 ⁻¹⁰
Dibenzo[a,l]Pireno (DB[a,l]P)	191-30-0	C ₂₄ H ₁₄	302	595	7.37	-
Dibenzo[a,h]Antraceno (DB[a,h]A)	53-70-3	C ₂₂ H ₁₄	278	524	6.50	1.3×10 ⁻¹¹ (a)
Benzo[g,h,i]Perileno (B[g,h,i]P)	191-24-2	C ₁₂ H ₂₂	276	>500	7.10	1.4×10 ⁻¹¹
Indeno[1,2,3-c,d]Pireno (I[1,2,3-c-d]P)	193-39-5	C ₂₂ H ₁₂	276	N.D	6.50	1.3×10 ⁻¹¹
Dibenzo[a,e]Pireno (DB[a,e]P)	192-65-4	C ₂₄ H ₁₄	302	N.D	7.37	1.12×10 ⁻¹¹
Dibenzo[a,i]Pireno (DB[a,i]P)	189-55-9	C ₂₄ H ₁₄	302	N.D	7.37	1.12×10 ⁻¹¹
Dibenzo[a,h]Pireno (DB[a,h]P)	189-64-0	C ₂₄ H ₁₄	302	N.D	7.37	1.12×10 ⁻¹¹

K_{ow} Coeficiente de partición octanol-agua; Pv, presión de vapor a 25°C; N.D, no disponible; ^(a) presión de vapor a 20°C

niveles de estos compuestos en la atmósfera. El grado de producción de éstos depende de las condiciones meteorológicas, como el viento, la temperatura, la humedad y el tipo de combustible.

- Fuentes antropogénicas: las emisiones de fuentes antropogénicas se deben fundamentalmente a una gran industrialización y urbanización, generando serios problemas de contaminación en ciudades con una alta densidad poblacional. Las emisiones de PAHs procedentes de las industrias son producidas por la quema de combustibles como el gas, el petróleo y el carbón, y también como resultado del procesamiento de materias primas como el aluminio primario. Chen y col. [13] estudiaron las emisiones de PAHs de la pirólisis de llantas usadas siendo estas de 42,3 g/día con un factor de emisión (*emission factor, EF*) de 4 mg kg^{-1} .

En áreas urbanas, las fuentes móviles son la principal causa de las emisiones de PAHs. Éstos se emiten principalmente de los gases de escape de los vehículos, incluyendo automóviles, ferrocarriles, barcos, aeronaves y otros vehículos de motor.

- Fuentes domésticas: a pesar de que su repercusión medioambiental es casi insignificante en comparación con lo mencionado anteriormente, el hombre genera cantidades importantes de PAHs relacionadas con el consumo de tabaco y el procesado de productos alimentarios, tales como ahumados, alimentos preparados a la parrilla o sometidos a tratamientos térmicos severos. Las emisiones de PAHs procedentes de estas fuentes pueden ser un importante problema de salud debido a su prevalencia en ambientes interiores [14]. Los PAHs de bajo peso molecular que se originan en ambientes cerrados son la proporción predominante de los PAHs totales identificados en el aire para espacios residenciales de no fumadores. La toxicidad de mezclas de PAHs procedentes de fuentes cerradas es inferior a las que contienen grandes cantidades de PAHs de alto peso molecular [15].

Un estudio sueco estimó que en Estocolmo, la suma de 14 PAHs diferentes en el aire a nivel de calle era de 100-200 ng m⁻³, el Fenantreno resultó ser el PAH más abundante y el Benzo[a]Pireno se situó en niveles entre 1-2 ng m⁻³ [16]. En Italia, país con altos niveles de contaminación ambiental en las ciudades, la ingestión de PAHs por vía inhalatoria fue estimada en 370 ng/día para los PAHs totales y de 130 ng/día para los carcinógenos [17].

Los PAHs son considerados potenciales cancerígenos desde 1950 cuando se registró una elevada incidencia de cáncer de estómago en poblaciones que consumían considerables cantidades de productos ahumados. Desde entonces, en la población no fumadora la ingesta dietética fue considerada como la principal ruta de exposición a los PAHs [18,19], encontrándose trazas de PAHs en muchos alimentos: vegetales, aceites vegetales, frutas, cereales, carne a la parrilla, etc.

1.2.2. Factores de emisión

Los valores de los factores de emisión (*emission factor, EF*) son de utilidad para estimar la cantidad de PAHs generada en los procesos de combustión, llama abierta y pirólisis. Los inventarios sobre las emisiones atmosféricas se obtienen mediante una estimación:

$$\text{Emisión de PAHs} = \sum(\text{nivel de actividad}) \times EF \times (1 - \text{Control de eficiencia}/100)$$

La diferencia entre los valores de los factores de emisión medidos y los estimados es la mayor limitación en la construcción del inventario de PAHs. Se están desarrollando nuevos inventarios de emisión en varios países. La combustión de biocombustible en el 2004, contribuyó al 56,7% del total de los 16 PAHs prioritarios designados por la EPA. En la **Tabla II.2** se muestran los inventarios de emisión a escala global y para algunos países. Los datos están basados en emisiones del 2003 al 2004.

Tabla II.2. Inventario de emisiones (en Gigatoneladas, Gt) de PAHs global y para algunos países [20].

Fuentes	Global	USA	China	India	Brasil	Sudán	UK
Biocombustible	56.7	9.1	66.4	92.5	17.7	28.1	-
Quema forestal	17	3.3	-	-	66	-	-
Quema de la Savanna	-	-	-	-	4.5	69.7	-
Quema de madera	-	-	-	-	-	-	15.5
Quema de paja	-	-	2	3.2	1.2	-	4.3
Productos consumo	6.9	351	0.9	0.6	2.5	-	-
Combustibles	4.8	23	2	-	3	-	58.2
Carbón doméstico	3.7	-	10.7	1.3	-	-	-
Carbón industrial	-	-	-	-	-	-	1.7
Refinerías	2.4	8.7	1	-	1.7	-	-
Residuos de incineración	1.9	9.5	-	-	-	-	-
Otros	1.5	3.9	2.7	2.3	0.7	2.2	5.2
Total (Gigatoneladas)	530	32	114	90	19	5	-

Este inventario muestra una reducción de emisiones de 16 PAHs (Naftaleno, Acenaftileno, Acenafteno, Fluoreno, Fenantreno, Antraceno, Fluoranteno, Pireno, Benzo[a]Antraceno, Criseno, Benzo[b]Fluoranteno, Benzo[k]Fluoranteno, Benzo[a]Pireno, Dibenzo[a,h]Antraceno, Indeno-1,2,3-cd-Pireno, Benzo[g,h,i]Perileno) asociada con países desarrollados y un incremento de emisiones de estos compuestos en países todavía en vías en desarrollo, debido sobre todo a la limitación de recursos tecnológicos y teniendo en cuenta el EF_{PAHs} para cada país/región.

H. Shen y col. [21] continuaron con el estudio de predicciones de emisiones de PAHs mediante modelos de regresión para estimar los EF_{PAHs} . En el año 2007, la emisión atmosférica total anual de los 16 PAHs fue de 504 gigagramos (Gg) (331-818 Gg como rango intercuartil mediante simulación de Monte Carlo), lo que es equivalente a 76 g per capita por año.

La **Figura II.3** muestra las contribuciones relativas de varias fuentes de emisión de los PAHs totales a nivel mundial y para varios países en el 2007.

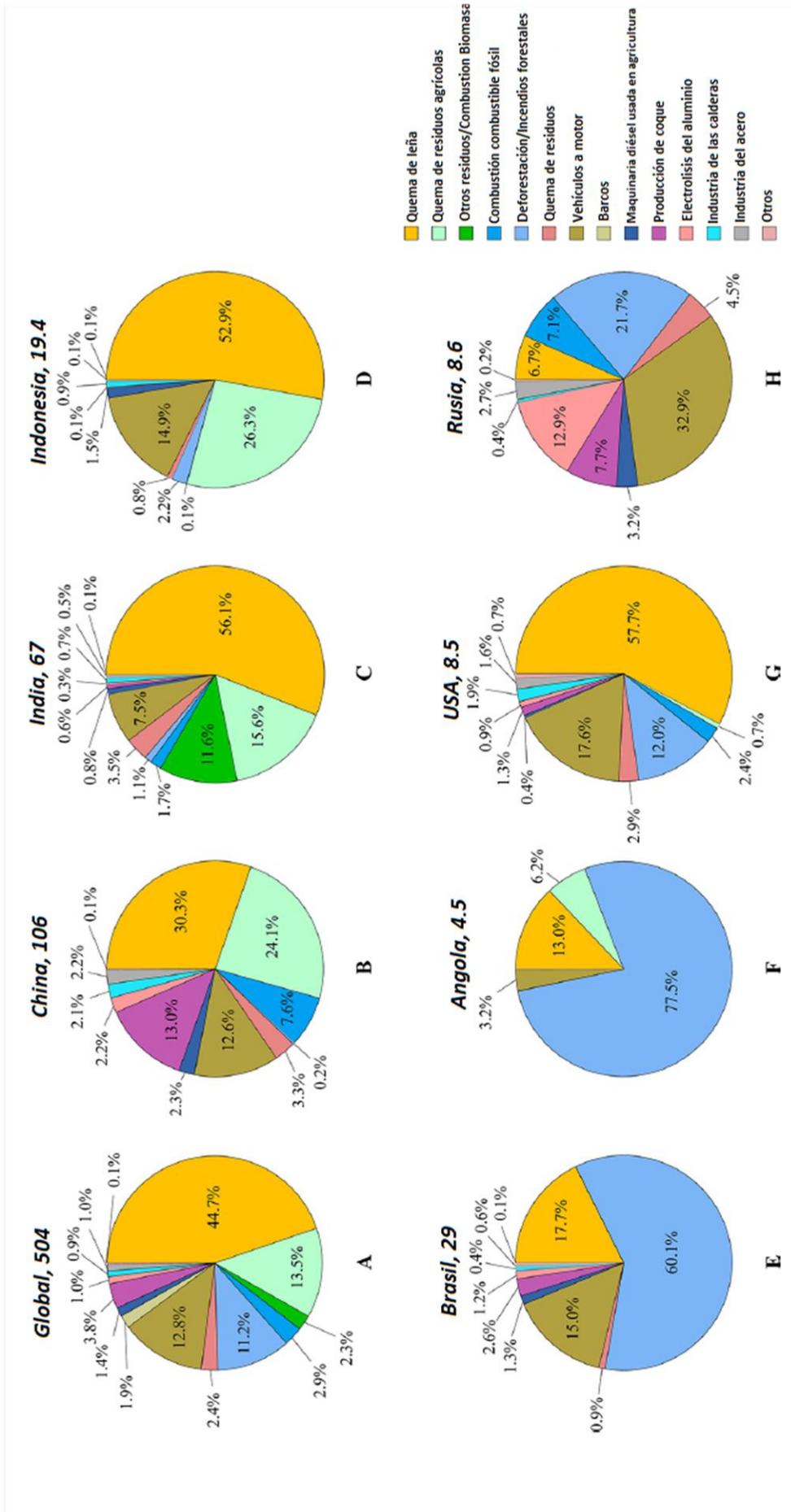


Figura II.3. Perfiles de emisiones de PAHs (Gg) a nivel mundial (A) y varios países representativos incluyendo China (B), India (C), Indonesia (D), Brasil (E), Angola (F), Estados Unidos (G) y Rusia (H) en 2007.

Entre las emisiones globales, el 6.19% pertenecen a compuestos carcinógenos de alto peso molecular y el porcentaje de PAHs carcinógenos fue más elevado en los países en desarrollo (6.22%) que en los países desarrollados (5.73%), debido a lo anteriormente mencionado relacionado con la disparidad de tecnologías disponibles. El impacto de emisiones de PAHs sobre la salud es mayor en las regiones del mundo con elevadas emisiones antropogénicas, puesto que hay una correlación entre las elevadas emisiones y la elevada densidad poblacional. Las emisiones globales de PAHs registrada en 1995 eran de 592 Gg y descendieron gradualmente a 499 Gg en el 2008. La simulación prevista de emisiones de PAHs para el período que va desde el 2009 al 2030 prevé una disminución de los niveles, tanto para países en desarrollo como los ya desarrollados que se sitúa entre el 46-71% y el 48-64%, respectivamente.

1.3. TOXICIDAD

1.3.1. Efectos sobre la salud humana

La primera referencia histórica con relación a estos compuestos se remonta hacia el año 1775, cuando un cirujano inglés, Sir Percival Pott, descubrió un predominio exageradamente elevado de un tumor maligno en los genitales entre los trabajadores de una industria de limpieza de chimeneas [22]. En 1930 se describió el cáncer de pulmón en los trabajadores de la industria del acero y del coque y ya en el 1933 Cook, Hewett y Hieger demostraron que el Benzo[a]Pireno presente en el alquitrán de hulla era cancerígeno.

No todos los PAHs han demostrado tener efectos carcinogénicos, genotóxicos y mutagénicos y muchas veces el efecto se atribuye a la presencia conjunta de más de un compuesto de la familia y de algunos de sus derivados, principalmente los nitroderivados [11]. La Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (*International Agency for Research on Cancer, IARC*), dependiente de la Organización Mundial de la Salud (*World Health Organization, WHO*) clasifica algunos PAHs dependiendo del conocimiento de su carcinogenia [23]. En la **Tabla II.3** aparece la relación de dichos PAHs:

Tabla II.3. PAHs que presentan carcinogenicidad conocida, posible o probable.

PAHs	Clasificación según su potencial carcinogénico
Naftaleno	2B
Benzo[a]Antraceno	2B
Benzo[b]Fluoranteno	2B
Criseno	2B
Benzo[a]pireno	1

1: Cancerígeno para los humanos; 2B: Posiblemente cancerígeno para los humanos.

- Grupo 1: Compuesto cancerígeno para los humanos

Los compuestos que se encuentran en esta categoría muestran evidencias suficientes de su capacidad carcinogénica en humanos. Con carácter excepcional se pueden agrupar en esta categoría compuestos cuya carcinogénica en humanos sea menor que suficiente, pero que su capacidad carcinogénica en animales sea evidente y existan pruebas de que esos compuestos actúan mediante mecanismos carcinogénicos en humanos expuestos a ellos.

- Grupo 2

Dentro de este grupo están los compuestos que con casi toda seguridad tienen capacidades carcinogénicas en humanos, al igual que aquellos de los que no se dispone de datos de su actividad en humanos, pero que su capacidad carcinogénica en animales está demostrada. Existen dos subgrupos:

- Grupo 2A: Probablemente cancerígeno para los humanos*

En esta categoría se agrupan los compuestos que poseen unas evidencias limitadas del poder carcinogénico en humanos y evidencias suficientes de poder ser carcinogénicos en animales. En algunos casos, un compuesto puede ser clasificado en esta categoría cuando no hay evidencias suficientes de su poder carcinogénico en humanos, pero existen las necesarias en animales.

- Grupo 2B: Posiblemente cancerígeno para los humanos*

Aquí se encuentran agrupados los compuestos con evidencias limitadas en cuanto a su capacidad carcinogénica en humanos o con evidencias menores a suficiente en animales.

- Grupo 3: No clasificable como cancerígeno para los humanos

En esta categoría se agrupan los compuestos con evidencias limitadas en cuanto a su capacidad carcinogénica en humanos y con evidencias menores a suficiente en animales.

- Grupo 4: Probablemente no cancerígeno para los humanos

En esta categoría, se agrupan los compuestos que no evidencian poder cancerígeno en humanos ni en animales.

La EPA ha clasificado los siguientes siete PAHs: Benzo[a]Antraceno, Benzo[a]Pireno, Benzo[b]Fluoranteno, Benzo[k]Fluoranteno, Criseno, Dibenzo[a,h]Antraceno y Indeno[1,2,3-cd]Pireno como probables agentes cancerígenos para los humanos [24].

1.3.1.1. Vías de exposición

El impacto de los PAHs sobre la salud depende principalmente del tiempo y la vía de exposición, la cantidad o concentración de estos compuestos a los que el individuo está expuesto, así como la toxicidad relativa de los PAHs. En la población humana la vía respiratoria es considerada como la más importante, particularmente para los individuos ocupacionalmente expuestos. Un esquema propuesto para la carcinogenicidad por exposición ambiental considera las siguientes etapas: (1) exposición, (2) activación metabólica, (3) formación de aductos entre PAHs y ADN, (4) mutaciones en genes críticos como, por ejemplo, el p53 (gen represor de tumores) y (5) sucesión de mutaciones en otros genes [25,26].

Del mismo modo, el contacto dérmico y la ingestión son también de gran importancia. Tanto es así, que en 2008 la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (*European Food Safety Authority, EFSA*) declaró un conjunto de marcadores en alimentación, puesto que hasta la fecha era considerado sólo el Benzo[a]Pireno. Se sugirió la necesidad de PAHs adicionales para establecer un perfil de contaminación más fiable. Una combinación de dos PAHs conocidos como PAH2 (Benzo[a]Pireno + Criseno), cuatro PAHs específicos designados como PAH4 (PAH2+ Benzo[a]Antraceno + Benzo[b]Fluoranteno), y otros ocho PAH8 (PAH4 + Benzo[k]Fluoranteno, Benzo[a]Pireno, Dibenzo[a,h]Antraceno e Indeno[1,2,3-cd]Pireno) fueron introducidos

como marcadores más precisos. Siguiendo estas pautas, la Comisión Europea (2011) [27] estableció unas directrices para los niveles máximos de los PAH4 en matrices de comida que se encuentran recogidos en la **Tabla II.4**.

Tabla II.4. Niveles máximos de Benzo[a]Pireno en alimentos.

Productos alimentarios	Benzo[a]Pireno ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Carne ahumada y otros ahumados	2
Carnes y pescados ahumados	5
Crustáceos y cangrejos ahumados	2
Moluscos (frescos o congelados), productos cárnicos expuestos térmicamente	5
Moluscos ahumados	6
Aceites y grasas	2
Cereales basados en productos infantiles	1
Formula de leche para niños	1
Chocolates	5

1.3.1.2. Metabolismo

Actualmente, se considera que los PAHs son previamente activados en el organismo a través de múltiples pasos de activación metabólica mediante enzimas específicas, antes de ejercer su efecto como disruptores endocrinos o cancerígeno/mutágeno [28]. Debido a la elevada lipofilia de esta clase de compuestos su biodisponibilidad después de la ingestión o inhalación es significativa [29]. Una vez se convierten en reactivos electrofílicos, éstos pueden interaccionar covalentemente con macromoléculas celulares como el ADN, ARN o proteínas [30]. La actividad carcinogénica se expresa a través de la biotransformación de los compuestos a reactivos intermedios capaces de enlazar con macromoléculas del tipo del ADN e inducirlo a romper sus cadenas y mutándolo, provocando el origen de tumores. En la **Figura II.4** se esquematiza un proceso de mutagénesis del ADN por los derivados del Benzo[a]Pireno. Cuando una sustancia entra en el organismo, éste trata de eliminarla solubilizándola. Como los PAHs son poco solubles en agua, el organismo se encarga de transformarlos en derivados hidrosolubles, los cuales en presencia de agua se hidratan dando lugar a dioles, sustancias que se excretan fácilmente. Pero algunos de estos dioles sufren una segunda epoxidación de forma regio y estereoselectiva para formar diolepóxidos, que son los verdaderos agentes cancerígenos, ya que en presencia del

ácido desoxirribonucleico, el grupo $-NH_2$ de la base nitrogenada de éste produce un ataque nucleofílico sobre el epóxido. La unión del hidrocarburo a la base nitrogenada impide que este encaje adecuadamente en la doble hélice del ADN, impidiendo el establecimiento de puentes de hidrógeno con la base nitrogenada conjugada de la hebra opuesta, con el consiguiente origen de la mutación.

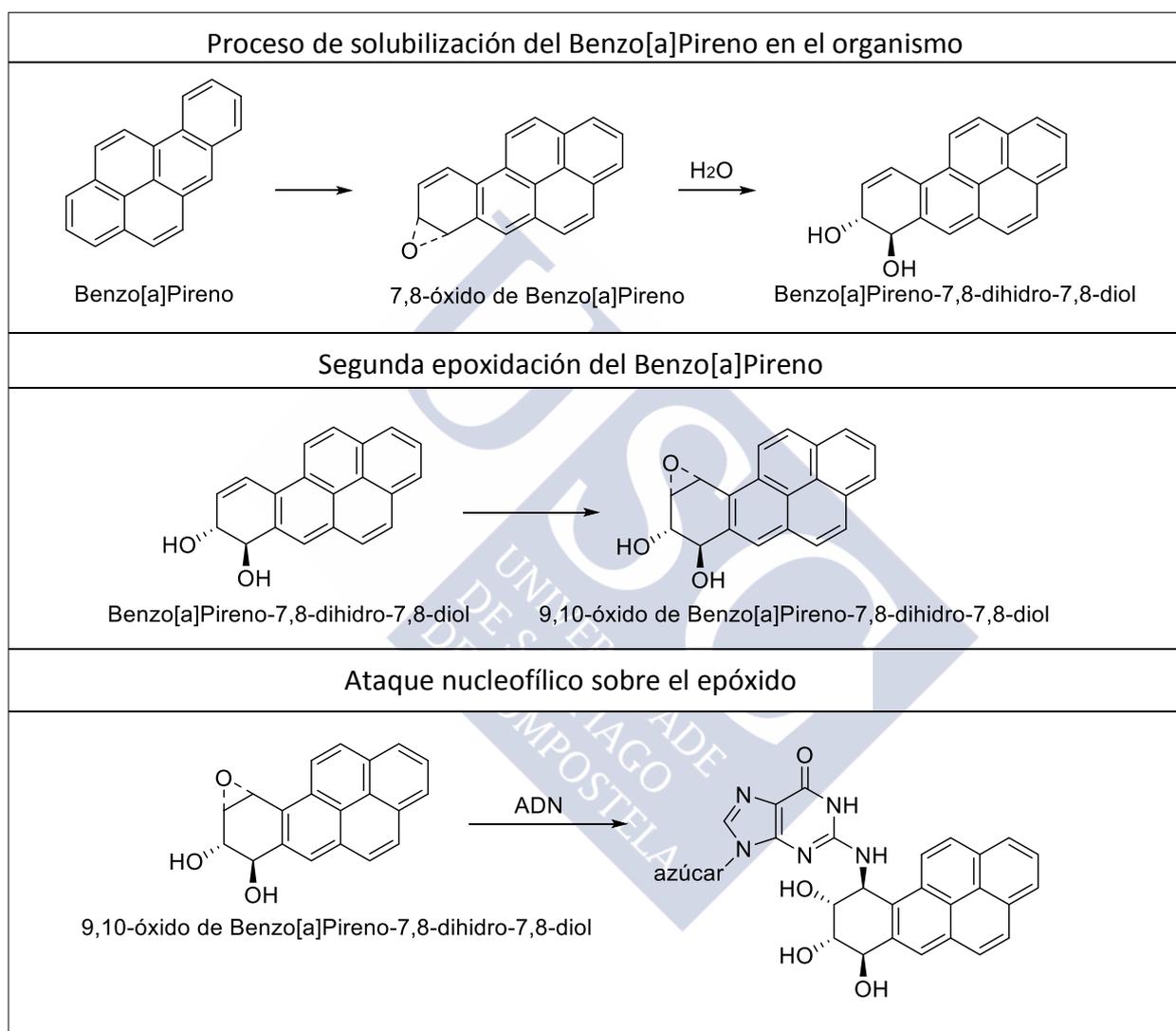


Figura II.4. Proceso de mutagénesis del ADN por el Benzo[a]Pireno.

1.3.2. Productos de fotorreacción

Una de las principales vías de transformación de PAHs es la atmosférica, mediante la reacción de radicales hidroxilo (OH), ozono y radicales nitrato (NO_3) [31,32] para dar lugar a la formación de un amplio rango de productos, incluyendo los

nitro-PAHs y quinonas y otras especies polares de aún más pronunciada mutagenicidad/toxicidad que sus precursores originales [33].

1.3.2.1. Formación de nitro-PAHs

Las reacciones en fase gas de los PAHs para dar lugar a la formación de nitro-PAHs (NPAHs) es iniciada por el ataque de radicales OH y/o NO₃ en la posición de mayor densidad electrónica en el anillo aromático, seguida por la adición de NO₂ con la posterior pérdida de H₂O o HNO₃, respectivamente [34]. En contraposición con esto, la nitración heterogénea puede seguir un mecanismo diferente. Se observó, en estudios previos, que las reacciones heterogéneas de Pireno y Fluoranteno con los radicales NO₃ y N₂O₅ dan lugar a la formación de diferentes isómeros del nitropireno y nitrofluoranteno a las que se corresponderían con las reacciones en fase gas [35]. La formación de NPAHs a partir de reacciones heterogéneas de PAHs que contienen en sus estructura de 2 a 5 anillos ha sido estudiada con los radicales NO₂ y N₂O₅ [35,36,37], mientras que solamente un número limitado de trabajos investigaron la formación de NPAHs a partir de PAHs cuyas estructuras exhibieran más de 5 anillos aromáticos [38]. Los nitrobenzopirenos y el nitroperileno (Peso Molecular, 297) son los NPAHs con mayor peso molecular detectados en la atmósfera [39,40]. En la **Figura II.5** se propone el mecanismo de formación de NPAHs en fase gas.

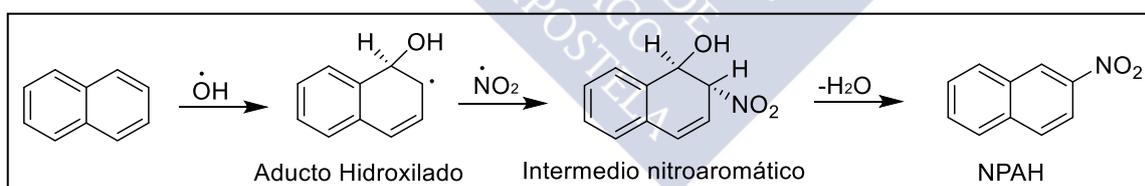


Figura II.5. Mecanismo general de nitración de PAHs vía reacción en fase-gas con radicales OH.

La orientación del grupo nitro es típicamente descrita como *paralela*, indicativa de una torsión de ángulo que es coplanar con la parte aromática, o *perpendicular*, una disposición fuera de plano del grupo nitro [41]. Chapman y col. [42] han correlacionado la degradación fotoquímica de los nitroarenos con la disposición fuera de plano del grupo nitro respecto a la parte aromática. Un resumen de los pasos propuestos se recoge en la **Figura II.6**.

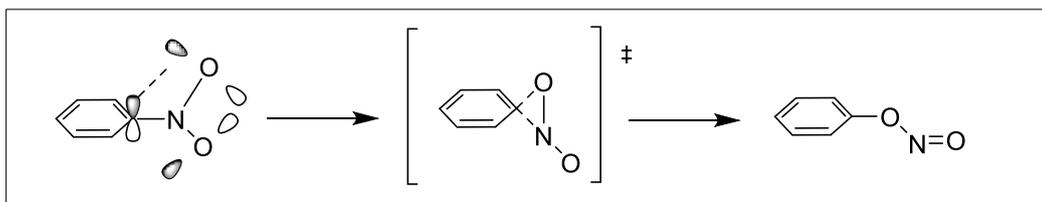


Figura II.6. Representación del reordenamiento perpendicular para la conversión nitro-a-nitro.

En cuanto a los aspectos moleculares, estos derivados son capaces de reaccionar con el ADN u otras macromoléculas mediante una activación metabólica previa. Así pues, un intermediario electrofílico puede reaccionar con grupos nucleofílicos del ADN o con grupos nucleofílicos de otras macromoléculas, como la albúmina, la hemoglobina, etc. En la **Figura II.7** se adjunta un ejemplo de lo mencionado.

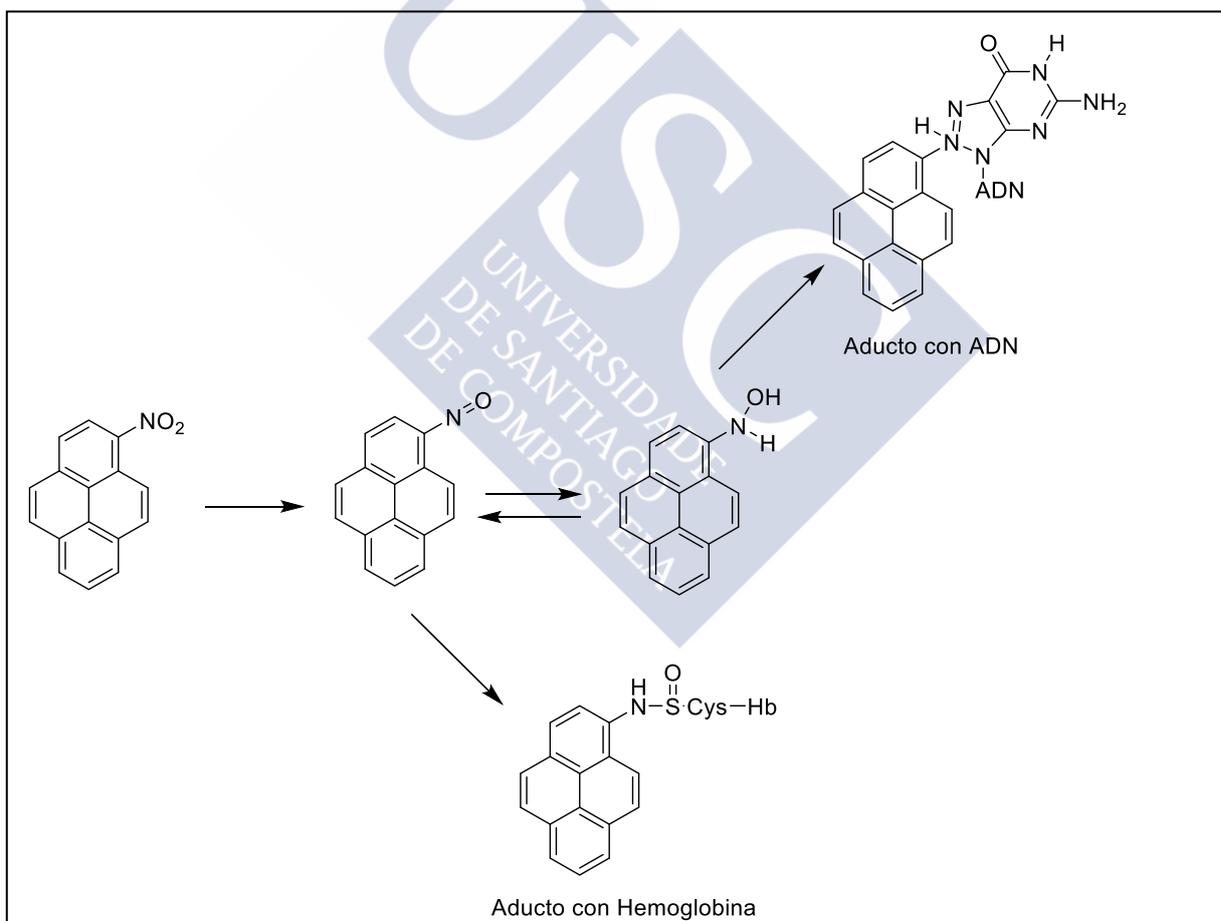


Figura II.7. Activación metabólica del 1-nitropireno y la formación de aductos de ADN y hemoglobina [43].

1.3.2.2. Formación de quinonas

Recientemente, se ha prestado gran atención a la formación de los derivados oxigenados de los PAHs, en particular, las quinonas, las cuales contienen dos grupos carbonilo en una estructura de dienos totalmente conjugada. La fotooxidación del PAH padre produce productos hidroxilados, quinonas y aperturas de anillos.

Dependiendo del tipo de PAH, habrá diferentes posiciones geométricas que resultarán más regioselectivas que otras y cuando la luz incida en ellas en presencia de oxígeno molecular, formarán los correspondientes endoperóxidos como intermediarios de reacción, que seguidos de un reordenamiento y posteriores oxidaciones, dan lugar a las correspondientes quinonas como producto final. En la **Figura II.8** aparece el mecanismo propuesto para la formación de la 9,10-Antraquinona y el Benzo[a]Antraceno-1,2-quinona en disolución acuosa [9].

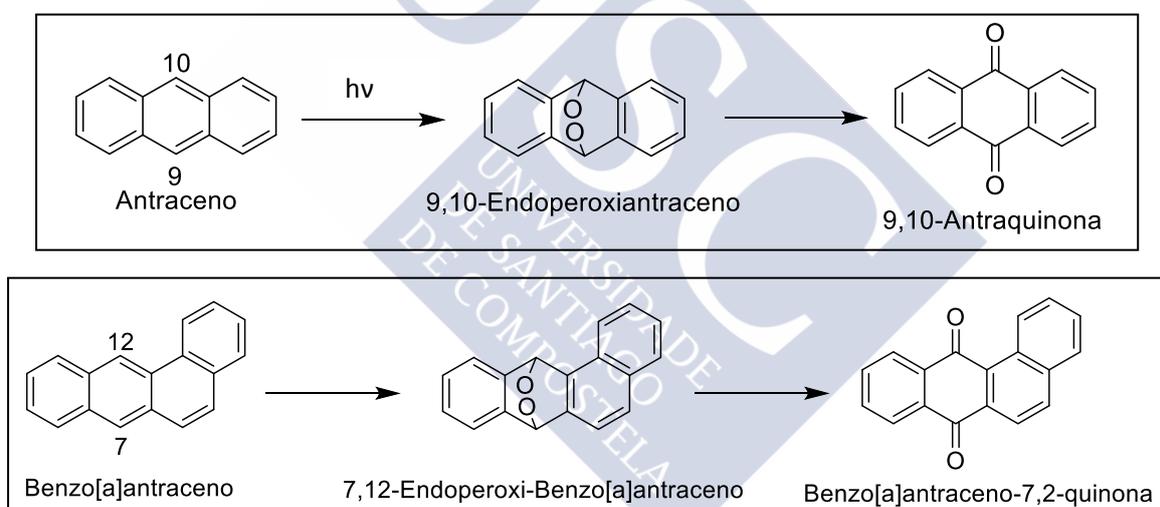


Figura II.8. Mecanismo de fotooxidación del antraceno y el Benzo[a]antraceno.

1.3.2.3. Formación de PAHs halogenados

Los PAHs halogenados han sido detectados en el medioambiente desde los años 80, y al igual que sus precursores, se encontró que exhibían propiedades genotóxicas, incluyendo problemas relacionados con la mutación y el cáncer. Una amplia variedad de cloro-PAHs, bromo-PAHs y bromo-cloro-PAHs fueron identificados en diferentes fuentes medioambientales como son el aire urbano, suelos y aguas de consumo [44-49]. Estos PAHs halogenados encontrados en el medio ambiente, contienen en su mayoría de 2 a 6 anillos aromáticos. Algunas de las propiedades físico-químicas de

estos nuevos compuestos cambian con respecto a sus precursores. Por ejemplo, los valores de la constante de partición octanol-agua (K_{ow}) para los halo-PAHs son ligeramente mayores que los que muestran los PAHs. Generalmente, un incremento en el valor del $\log K_{ow}$ refleja una mayor afinidad por un compuesto que se acumula en los lípidos. Esto significa que los halo-PAHs pueden ser más lipofílicos y más fácilmente bioacumulables en el organismo que los PAHs originales [50].

Oehme y col. [51] identificaron una serie de PAHs clorados procedentes de la incineración de residuos. La reacción de los residuos y los PAHs bajo incineración a altas temperaturas facilita la formación de PAHs clorados y bromados. Nilsson y Ostman [52] analizaron muestras de aire urbano y detectaron PAHs clorados, como el 9-10-diclorofenantreno o el 9,10-dicloroantraceno entre otros. Desarrollaron una hipótesis que concluía que la formación de los cloro-PAHs resultaba de la reacción de los PAHs con el cloro disuelto en fase gas.

Sugiyama y col. [44,53] determinaron que la radiación solar en el proceso de cloración del pireno en suelos dio lugar a la formación de 1-cloropireno y dicloropireno, la extensión de formación está sujeta al tiempo de irradiación, tipo y procedencia del suelo en cuestión y el contenido de agua del mismo.

1.4. DISTRIBUCIÓN DE LOS PAHs EN EL MEDIO AMBIENTE

Los PAHs pueden encontrarse en casi todas partes distribuidos en el medio ambiente, bien sea en suelos, sedimentos, agua o aire, plantas o animales, como resultado de procesos naturales y antropogénicos. La contribución de las fuentes naturales, como son los incendios forestales, las erupciones volcánicas o las filtraciones naturales de petróleo, es mínima comparada con la actividad antropogénica. Los procesos de combustión, especialmente, la combustión incompleta de materiales orgánicos durante actividades industriales (por ejemplo la combustión de combustibles fósiles, la combustión de residuos industriales o la de madera) son la principal fuente de emisión [14].

Los PAHs son liberados en la atmósfera principalmente por emisiones gaseosas y una vez en ella, estos son susceptibles a ser transportados a cortas o largas distancias y eliminados mediante deposición húmeda o seca en medios acuáticos, suelos y vegetación. Por otro lado, estos contaminantes pueden alcanzar los sistemas acuáticos a través de filtraciones naturales de petróleo, mediante la deposición atmosférica y/o a través de descargas accidentales o intencionadas de la extracción de petróleo, de su transporte o de la refinería. La presencia de PAHs en el medio acuático puede dar lugar a la bioacumulación en organismos acuáticos a través de la cadena alimentaria. Adicionalmente, una pequeña parte de estas sustancias pueden permanecer solubilizadas. En los suelos, los PAHs pueden ser volatilizados, solubilizados o adsorbidos en materia orgánica o materia particulada, siendo parte de la fase gaseosa, líquida o sólida, respectivamente. Independientemente del medio en el que se encuentren los PAHs, estos pueden ser transferidos a los seres vivos, bioacumulándose en plantas y animales a través de la cadena alimentaria [54]. Un esquema de lo mencionado se recoge en la **Figura II.9**.



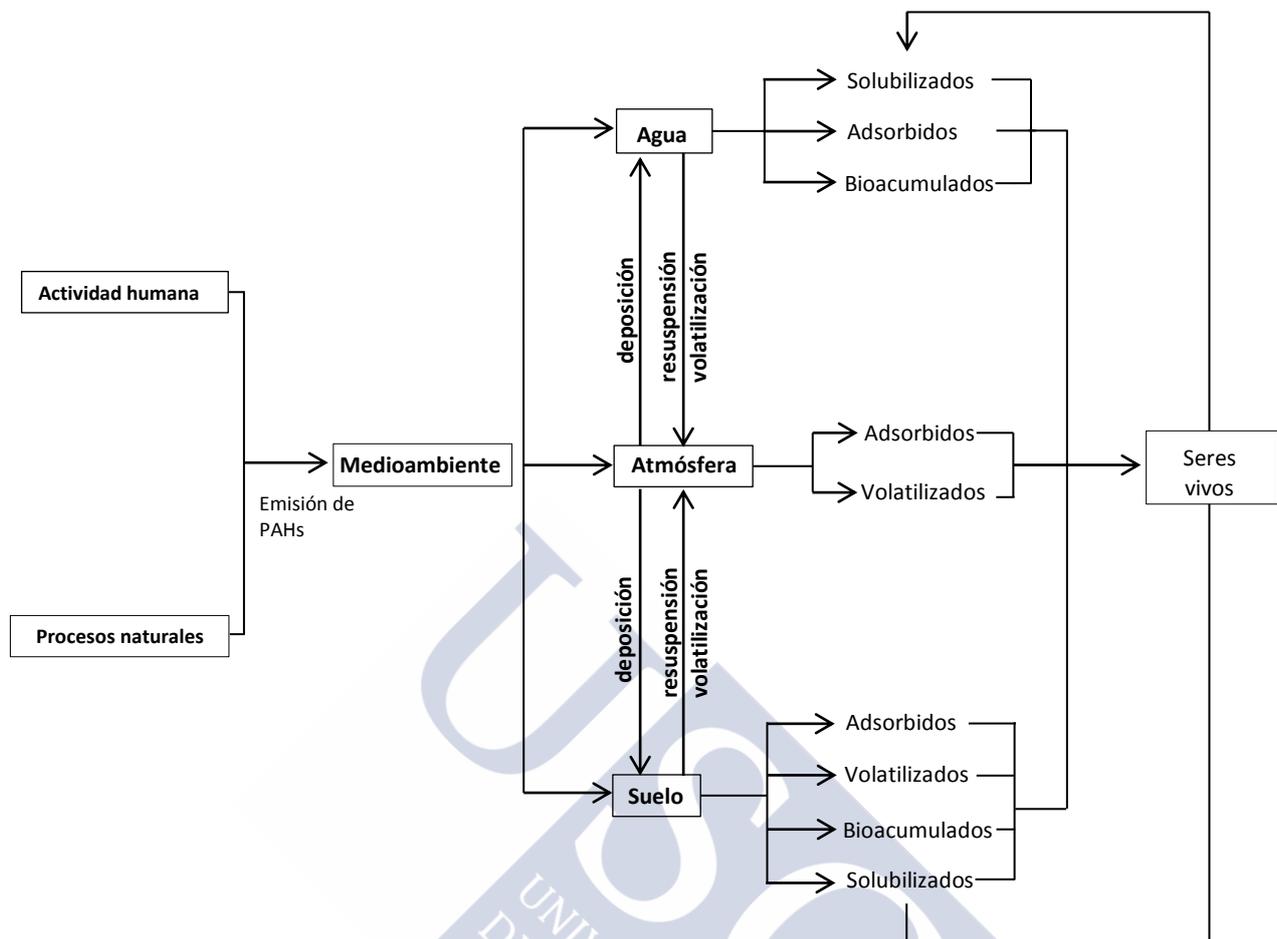


Figura II.9. Fuentes de emisión de PAHs y los principales medios de contaminación.

1.4.1. Presencia de PAHs en aire

La calidad del aire es un aspecto importante que debe ser monitorizado y controlado puesto que la atmósfera es esencial para sostener la vida en la Tierra. La materia particulada es un contaminante importante presente en la atmósfera que puede penetrar en el sistema respiratorio en función de su diámetro aerodinámico causando riesgos en la salud [55]. Dependiendo de su volatilidad, los PAHs en la atmósfera pueden estar presentes en fase gas o adsorbidos en las partículas atmosféricas [56,57]. Aquellos PAHs con 2 ó 3 anillos aromáticos están presentes principalmente en fase gaseosa, mientras que los que tienen en su estructura 4 o más anillos aromáticos están enlazados a la fase particulada [58].

Para reducir las concentraciones de PAHs atmosféricas, se ha invertido tiempo y esfuerzo. La disminución de las emisiones de estos compuestos se ha logrado mediante la implementación de leyes y regulaciones, mejorando para ello las tecnologías de combustión o empleando fuentes de energía menos sucias que el fuel, como por ejemplo el gas natural [59].

La evaluación de la calidad del aire a nivel mundial es esencial para un mejor conocimiento de la química atmosférica de los PAHs. Se han realizado estudios sobre la tendencia de los PAHs en el ambiente en varias ciudades y diferentes sitios, aunque actualmente no existe un parámetro estricto de calidad estándar para estos compuestos. La **Directiva de la Unión Europea (European Union, EU) 2004/107/CE** propone un valor objetivo de 1 ng m^{-3} para el Benzo[a]Pireno para el contenido promedio de la fracción de PM_{10} (*Particulate Matter*, $10 \mu\text{m}$ de diámetro) en un año [60]. En el Reino Unido se recomienda un valor guía (promedio anual) de 0.25 ng m^{-3} de Benzo[a]Pireno [14].

De acuerdo con el inventario de la EU sobre emisiones, entre los años 1990 y 2012, las emisiones de PAHs emitidas en los 28 países de la unión (28-EU) el 51% se corresponde con el Benzo[a]Pireno, el 41% para el Benzo[b]Fluoranteno, 53% para el Benzo[k]Fluoranteno y el 39% para el Indeno[1,2,3-cd]Pireno [61].

1.4.2. Presencia de PAHs en suelos y lodos

Como ya se ha mencionado anteriormente, los PAHs menos volátiles tienden a acumularse en suelos y sedimentos. Los valores de temperatura y/o las precipitaciones así como las características del suelo (acidez, fracciones de materia orgánica, pH...) afectan de manera importante en la movilidad de estos compuestos en el medio ambiente [62]. En general los tiempos de vida media de estos contaminantes en suelos se estiman entre 2.2 y 8 años para los PAHs más ligeros y los más pesados, respectivamente [63].

Los lodos se originan como un subproducto de los procesos de tratamiento de aguas residuales. Debido a los procesos fisicoquímicos a los que son sometidos, éstos tienden a acumular metales pesados y trazas de compuestos orgánicos presentes en las aguas residuales. Sin embargo, son ricos en materia orgánica y nutrientes. Por estas

dos razones este tipo de residuo es empleado como fertilizante [64]. Entre los contaminantes orgánicos persistentes, los PAHs son encontrados frecuentemente a niveles de concentración relativamente altos: 1.4mg kg^{-1} [65,66]. En Europa el empleo de lodo en agricultura está regulado bajo la denominada Directiva de lodos de depuradora (*Sewage Sludge Directive*), **Directiva 86/278/EEC** [67], la cual está ideada para limitar y regular su uso con el fin de prevenir efectos dañinos en el suelo, la vegetación y los humanos. En la **Tabla II.5** se recogen las concentraciones detectadas de algunos PAHs en lodos en la EU.



Tabla II.5. Concentración de PAHs en muestras de lodo de depuradora para varios países de la Unión Europea (UE).

	País ^a												
	España		UK		Rumania	República Checa		Francia		EU ^e		Italia	
	Min. Val.	Max. Val.	Min. Val.	Max. Val.	Val. Prom.	Min. Val.	Max. Val.	Min. Val.	Max. Val.	Min. Val.	Max. Val.	Min. Val.	Max. Val.
ACN (µg kg ⁻¹)	<0.15	300	1700	6600	0.004	- ^c	- ^c	<DL ^d	2710	- ^c	- ^c	1	184
FLU (µg kg ⁻¹)	<0.06	750	3600	8100	0.022	- ^c	- ^c	<DL ^d	1860	- ^c	- ^c	1	228
FEN (µg kg ⁻¹)	20	3000	3200	16000	0.07	17	3910	860	5700	29.9	5552	1	673
FLUO (µg kg ⁻¹)	33	570	1400	7400	- ^c	18	3630	1270	9020	34.5	3217	2	844
PIR (µg kg ⁻¹)	58	731	2100	5600	0.024	14	2550	1640	14460	47.2	2637	1	1118
B(jkb)F (µg kg ⁻¹)	<0.15	242	1800	11700	0.006 ^b	10 ^b	2736 ^b	1030 ^b	3708 ^b	9.9 ^b	2967 ^b	2	1511
B(a)P (µg kg ⁻¹)	17	100	690	4000	0.003	7	1440	490	1650	17.9	1476	1	1341
B(ghi)P (µg kg ⁻¹)	<0.21	60	470	2300	0.032	3	940	800	8300	29.7	1335	1	1030
I(123cd)P (µg kg ⁻¹)	<0.07	88	390	2700	0.022	1	762	420	2080	24.2	1401	1	1310
ΣPAHs (µg kg ⁻¹)	308	5118	18000	50000	- ^c	- ^c	- ^c	- ^c	- ^c	- ^c	- ^c	11	3917
Nº muestras	38		14		12	45		45		32		452	
Referencia	[68]		[69]		[70]	[71]		[72]		[73]		[64]	

^a Datos recogidos para 9 PAHs seleccionados en el Working Document de la UE para lodos: acenafeno (ACN), fluoreno (FLU), fenantreno (FEN), fluoranteno (FLUO), pireno (PIR), benzo(k+j+b)fluoranteno (B(kjb)F), benzo(a)pireno (B(a)P), benzo(ghi)perileno (B(ghi)P), indeno(123-cd)pireno (I(123cd)P)

^b Está referido a benzo(b+k)fluoranthene

^c Datos no disponibles

^d Rango de los límites de detección, de acuerdo con las muestras, desde 0.02 a 2 mg kg⁻¹

^e Estudio de la Comisión Europea

1.4.3. Presencia de PAHs en aguas

Los PAHs son contaminantes ubicuos que se pueden introducir de manera sencilla en ambientes acuáticos, siendo su presencia un serio problema medioambiental puesto que tanto los ríos como los lagos y/o embalses son normalmente utilizados como fuentes de suministro de agua potable, y como consecuencia su contaminación es particularmente indeseable. Las fuentes de emisión más usuales son la deposición atmosférica, el escurrimiento superficial, las fugas de aceite, los efluentes industriales, etc [74]. Debido a los elevados coeficientes de partición y a su elevada lipofilia las concentraciones de los PAHs disueltos en agua son bajas. En la **Tabla II.6** se recogen las concentraciones de PAHs encontradas en aguas de algunos ríos europeos.

Tabla II.6. Concentración (ng mL⁻¹) de PAHs en aguas superficiales de algunos ríos europeos.

PAH	Río Danubio (Alemania)	Río Elba (Alemania)	Río Támesis (UK)
Fluoranteno	60-110	7.6-40	140-360
Pireno	-	7.3-33	-
Benzo[a]Antraceno	<10-10	2-12	-
Criseno	-	3.5-26	-
Benzo[b]Fluoreno	10-20	3-30	40-120
Benzo[k]Fluoreno	<10	2-13	-
Benzo[a]Pireno	<10	1.9-16	130-350
Dibenzo[a,h]Antraceno	-	0.53-1.6	-
Benzo[g,h,i]Perileno	<10	2.8-18	60-160
Indeno[1,2,3-c,d]Pireno	<10	2.3-15	50-210

La **Directiva 80/778/CCE** de la Comunidad Europea establece un nivel máximo de PAHs en agua potable de 0.2 µg L⁻¹ para Fluoranteno, Benzo[a]pireno, Benzo[b]Fluoranteno, Benzo[g,h,i]Perileno e Indeno[1,2,3-c,d]Pireno como compuestos de referencia. Los niveles máximos para la suma de PAHs en aguas superficiales puede llegar a 1 µg L⁻¹ dependiendo del procedimiento de tratamiento [75].

1.5. ELIMINACION DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

La eliminación de estos compuestos orgánicos de los distintos entornos del medioambiente incluye la biodegradación y la degradación fotoquímica o procesos de oxidación. Cada uno de los diversos procesos empleados en la eliminación afecta de forma diferente en cada PAH individual. Esto es debido, principalmente, al hecho de que cada PAH tiene una estructura única y una serie de propiedades físicas, químicas y biológicas características.

1.5.1. Biodegradación

Los primeros ensayos de biodegradación de PAHs fueron realizados en condiciones aerobias, sin embargo, estudios más recientes han demostrado que es posible llevar a cabo la degradación en medios anaerobios bajo condiciones desnitrificantes [76,77]. Para que las bacterias degraden cualquier PAH, éste debe estar biodisponible. Esta biodisponibilidad es efectiva cuando el PAH está disuelto o en fase vapor. Los PAHs absorbidos en las partículas del suelo no se degradan de manera sencilla porque los PAHs son separados de las enzimas y éstas a su vez son usadas por las bacterias para descomponerlas. De todos modos, la biodisponibilidad de un PAH concreto es difícil de predecir ya que, por ejemplo, el tiempo que puede llevar acumulado en el suelo es un factor importante.

Un aspecto destacable en la biodisponibilidad es la solubilidad de los compuestos. La solubilidad en agua de los PAHs depende fuertemente del peso molecular. Por ejemplo, la disposición de un carbono angular en un anillo es la configuración más estable termodinámicamente, pero en zonas abiertas que se hallan situadas entre los anillos bencénicos son susceptibles de ser atacadas por enzimas. La degradación también se puede ver afectada por inhibición competitiva. Esto ocurre cuando los sitios activos de las enzimas, usadas por las bacterias para descomponer los PAHs como fuente de carbono, no son específicos. Estas enzimas no específicas pueden atacar a otros compuestos presentes y los PAHs resistirán a la degradación [78].

1.5.2. Procesos convencionales

El proceso de oxidación química es ampliamente utilizado para eliminar estos compuestos en agua. Diversos estudios se han realizado empleando oxidantes como el ozono, el cloro o el permanganato potásico [79-82]. La extensión o el grado de eliminación va a depender de varios factores: el peso molecular y la estructura del compuesto, su estado físico, la temperatura y la fuerza del agente oxidante empleado [28].

Sin embargo, pueden aparecer problemas durante el proceso de descontaminación. Un ejemplo de ello es que el cloro ha mostrado una alta capacidad de reacción con la materia orgánica presente en el agua para producir la nueva formación de hidrocarburos halogenados altamente cancerígenos y mutágenos como son los trihalometanos y los ácidos haloacéticos, conocidos como subproductos de desinfección [83].

Entre los procesos de degradación química, los más empleados son la ozonización y la fotólisis directa.

1.5.2.1. Ozonización

En este proceso, la degradación de PAHs puede ocurrir a través de dos mecanismos: a) oxidación directa del compuesto mediante O_3 y b) oxidación indirecta por radicales $-OH$ de la transformación del O_3 a pH básico. La eliminación de los PAHs va a estar fuertemente condicionada por el pH del medio (disolución), puesto que la descomposición del O_3 está facilitada a altos valores de pH donde se produce el ataque mediante $-OH$. Por el contrario, en condiciones ácidas, el O_3 es más estable y se puede producir la oxidación de forma directa [84].

Las reacciones de oxidación directa entre el ozono y los PAHs dan lugar a la rotura de anillos mediante mecanismos electrofílicos, obteniendo como resultado la formación de bencenos hidroxilados y carboxilados, quinonas y derivados oxigenados de compuestos alifáticos. Además, es de especial mención que los compuestos intermedios de la reacción pueden experimentar oxidación directa con el ozono o con los radicales $-OH$, desencadenando una reacción competitiva con el contaminante

objetivo por las moléculas de ozono y/o los radicales -OH . Adicionalmente, la presencia de aniones en el medio, como Cl^- y CO_3^{2-} , presentes de forma natural en el agua, puede afectar negativamente a la degradación de PAHs [85]. Alebic-Juretic y col. describieron el Fluoranteno como el compuesto más estable al proceso de oxidación mediante ozono. Esta puede ser una razón de porqué el Fluoranteno está a menudo presente en altas concentraciones en el suelo [86].

1.5.2.2. Fotólisis directa

La fotólisis se define como la destrucción de un compuesto debido a reacciones iniciadas mediante la absorción de luz [87]. El mecanismo general de esta técnica consiste en la absorción de luz por el PAH provocando la excitación de los electrones en la molécula. Esta excitación crea una disposición estructural inestable y pueden suceder dos situaciones: a) retorno al estado fundamental de la molécula o b) ser transformada en un radical catiónico (PAH^+) y un electrón solvatado [54]. La degradación resulta más efectiva cuando los PAHs se encuentran en fase vapor o acuosa y apenas ocurre cuando los PAHs están adsorbidos a partículas en la atmósfera o en el suelo. Cuando los PAHs se encuentran en disolución, el O_2 presente en el agua puede reaccionar con el electrón solvatado formando $\text{O}_2^{\circ-}$ o $^1\text{O}_2$. Estas especies oxigenadas pueden reaccionar con la molécula orgánica para formar especies intermedias, las cuales pueden experimentar sucesivas oxidaciones y provocar la mineralización del compuesto original.

Las reacciones de fotodegradación dependen en gran manera de la estructura del PAH. En general, PAHs lineales y algunos que forman “clusters” se degradan rápidamente bajo la luz directa. PAHs con estructura angular (como por ejemplo el Fenantreno o el Dibenzo[a,h]Antraceno son mucho más lentos en el proceso. Esto es debido a que son moléculas estructuralmente más estables. Así mismo, la fotólisis tiende a ser más efectiva para los compuestos con bajo peso molecular, como el Naftaleno, porque éstos están más biodisponibles [77]. En la **Figura II.10** se muestra la ruta de degradación para el Antraceno.

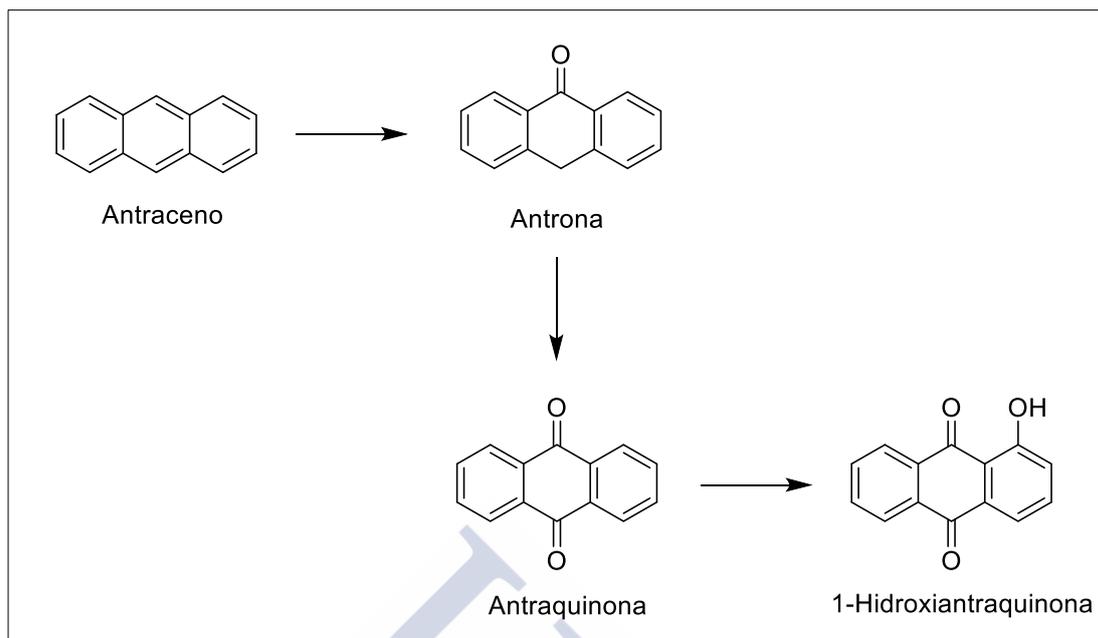


Figura II.10. Subproductos de transformación de la fotólisis del antraceno.

1.5.3. Procesos de oxidación avanzada

Los procesos de oxidación avanzada (*advanced oxidation processes, AOPs*) se refieren a varios métodos de oxidación química cuya característica en común es la producción de -OH . El radical -OH es altamente reactivo y es capaz de atacar y destruir las moléculas orgánicas más persistentes y tóxicas [88]. Estas técnicas emplean combinaciones de oxidantes, fuentes energéticas y catalizadores diferentes para producir -OH en agua. Éstas pueden clasificarse como procesos fotoquímicos y procesos no fotoquímicos. Los primeros incluyen técnicas que emplean la radiación ultravioleta o visible (UV/vis), desde la fotólisis en medio acuoso en ultravioleta de vacío hasta la fotocatalisis homogénea o heterogénea con semiconductores o con oxidantes químicos, incluyendo UV/O₃, UV/H₂O₂ y foto-Fenton (UV/H₂O₂/Fe²⁺). En contraposición, los procesos no fotoquímicos incluyen oxidación del agua sub y supercrítica, ozonización en medio alcalino, O₃/H₂O₂, y Fenton (H₂O₂/ Fe²⁺) [54]. Adicionalmente, los AOPs se pueden combinar con otros procesos, dando lugar a nuevos sistemas de degradación como por ejemplo electro-Fenton, foto-electro-Fenton, ultrasonidos/UV/TiO₂ o UV/O₃/H₂O₂, entre otros [89].

La eficiencia de estas técnicas de oxidación depende de varios parámetros como la dosis de oxidante, la intensidad de la luz UV/vis, el tiempo de reacción, el pH, la

cantidad de radical libre formada, así como la concentración inicial de contaminante objetivo y los constituyentes de la matriz del agua. Es importante señalar, que al igual que se mencionó en los casos anteriores, todos estos procesos son susceptibles de sufrir la oxidación de otras sustancias que se encuentran disueltas en la matriz acuosa. Zhang y col. [90] han confirmado que el efecto sinergista de la radiación UV y la catálisis con TiO₂ o ZnO fue eficiente en el estudio de degradación de PAHs en suelos contaminados. Los óxidos de hierro y los ácidos oxálicos pueden establecer la reacción de foto-Fenton sin necesidad de emplear H₂O₂ en fase sólida para aumentar la fotodegradación del Pireno bajo la radiación de UV [91].

1.6. LEGISLACIÓN

1.6.1. Normativa de los PAHs en el medio ambiente

A continuación se va a hacer un repaso sobre las directivas europeas y normas nacionales que regulan de manera directa o indirecta el control de niveles y emisiones de los hidrocarburos aromáticos policíclicos en diversos medios.

Aguas

La **decisión número 2455/2001/CE** del Parlamento Europeo y del consejo aprueba la lista de sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas y modifica la **Directiva 2000/60/CE**, en la que se incluyen medidas específicas para la reducción de vertidos de sustancias peligrosas y su supresión gradual. Las sustancias peligrosas se definen en la Directiva del Marco de Agua (*Water Framework Directive, WFD*) como sustancias o grupo de sustancias que son tóxicas, persistentes y que pueden causar bioacumulación, y otras sustancias o grupos de sustancias que entrañen un riesgo análogo. La lista de sustancias prioritarias (Anexo X de la Directiva del 2000/60) fue aprobada en la decisión del Parlamento Europeo y del consejo, incluyendo determinados hidrocarburos aromáticos policíclicos como sustancias prioritarias, en concreto, Benzo[a]Pireno, Benzo[b]Fluoranteno, Benzo[g,h,i]Perileno, Benzo[k]Fluoranteno, Indeno[1,2,3-cd]Pireno, Naftaleno* y Antraceno*[92].

* Esta sustancia prioritaria está sujeta a estudio para su identificación como posible "sustancia peligrosa prioritaria". La Comisión presentará al Parlamento Europeo y al Consejo una propuesta para su clasificación final en un plazo no superior a 12 meses tras la aprobación de esta lista. Esta revisión no afectará al calendario establecido en el artículo 16 de la Directiva 2000/60/CE para las propuestas de controles de la Comisión

El **Real Decreto 60/2011**, de 21 de enero, sobre las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas ha sido derogado recientemente por la aprobación del **Real Decreto 817/2015** del 11 de septiembre por el que se establecen los criterios de seguimiento y evaluación del estado de las aguas superficiales y las normas de calidad ambiental. A continuación, se adjunta la **Tabla II.7** con los límites para los PAHs considerados como prioritarios (Fluoranteno y Naftaleno) y aquellos considerados como peligrosos y prioritarios (Antraceno, Benzo[a]Pireno, Benzo[b]Fluoranteno, Benzo[g,h,i]Perileno, Benzo[k]Fluoranteno e Indeno[1,2,3-cd]Pireno).

Tabla II.7. Estándares control de calidad para PAHs en aguas superficiales [93].

Compuesto	NCA-MA Aguas superficiales continentales	NCA-MA Otras aguas superficiales	NCA-CMA Aguas superficiales continentales	NCA-CMA Otras aguas superficiales	NCA Biota
Antraceno	0.1	0.1	0.4 [0.1]	0.4 [0.1]	
Fluoranteno *	0.1 [0.0063]	0.1 [0.0063]	1 [0.12]	1 [0.12]	[30]
Naftaleno *	2.4 [2]	1.2 [2]	No aplicable [130]	No aplicable [130]	
Benzo[a]Pireno *	0.05 [1.7×10 ⁻⁴]	0.05 [1.7×10 ⁻⁴]	0.1 [0.27]	0.1 [0.27]	[5]
Benzo[b]Fluoranteno *	Σ=0.03	Σ=0.03	No aplicable [0.017]	No aplicable [0.017]	
Benzo[k]Fluoranteno *			No aplicable [8.2×10 ⁻³]	No aplicable [8.2×10 ⁻⁴]	
Benzo[ghi]Perileno *	Σ=0.02	Σ=0.02			
Indeno[123-cd]Pireno					

N.C.A. : Normas de Calidad Medioambiental

M.A.: Media Anual

C.M.A.: Concentración Máxima Admisible

Unidades: µg/L para las NCA-MA y NCA-CMA en agua y µg/kg de peso húmedo para NCA en biota

* Las NCA entre corchetes tendrán efecto a partir del 22 de diciembre de 2018, con objeto de lograr el buen estado químico de las aguas superficiales en relación con dichas sustancias a más tardar el 22 de diciembre de 2027 mediante programas de medidas incluidas en los planes hidrológicos de cuenca

Suelos

Los criterios establecidos para el control de calidad de los suelos llevado a cabo en Cataluña y Holanda contemplan entre otros contaminantes los niveles máximos de PAHs para que los suelos sean clasificados como aptos o no aptos para su uso (según sean residenciales o industriales), así como para determinar la calidad de las aguas subterráneas. Los niveles máximos para que un suelo destinado a uso no industrial se considere como contaminado por PAHs varía según el compuesto, los valores pueden ir desde 0.08 µg g⁻¹ de materia seca para el Benzo[a]Pireno, hasta los 100 µg g⁻¹ de

materia seca para el Antraceno. En el **Real Decreto 9/2005** del 14 de enero se establecieron los niveles genéricos de referencia para la protección de la salud humana y de los ecosistemas en función del uso que se le da al suelo [94].

Lodos

Durante más de una década, la Comisión Europea ha estado trabajando en el trazado de un plan en el que se establecerían unos límites para contaminantes orgánicos en lodos de depuradora, sin embargo actualmente no se encuentra implementada ninguna legislación. Esto es debido principalmente a la falta de datos y estudios sobre la contaminación de estos compuestos orgánicos en lodos [95]. Puesto que en agricultura es habitual su empleo como fertilizante de tierras ha surgido la necesidad de crear un borrador para una nueva directiva de la Comunidad Europea, restringiendo su uso. En dicho borrador [96], se establece un límite máximo de PAHs en lodos cuyo fin sea destinado a empleo en tierras de cultivo de $6 \mu\text{g g}^{-1}$, considerando la suma de varios PAHs: Acenafteno, Fenantreno, Fluoreno, Fluoranteno, Pireno, Benzo(b)Fluoranteno, Benzo(k)Fluoranteno, Benzo(j)Fluoranteno, Benzo(a)Pireno, Benzo(g,h,i)Perileno, e Indeno(1,2,3-cd)Pireno.

Aire ambiente

La normativa actual sobre calidad y evaluación del aire tiene su origen en la **Ley 38/1972**, de 22 de diciembre, de Protección del Ambiente Atmosférico y en la **Directiva 96/62/CE** (Directiva Marco de Calidad del Aire) [97], que establece los principios básicos de una estrategia para definir y fijar objetivos de la calidad del aire ambiente mediante la regulación de una serie de contaminantes entre los que se encuentran los PAHs debido a su potencial carcinogénico [98].

La **Directiva 2004/107/CE** del Parlamento Europeo y del Consejo del 15 de Diciembre del 2004 es la única derivada de la Directiva Marco original que sigue en vigor. En ella se hace mención al arsénico, el cadmio, el mercurio, el níquel, y los hidrocarburos aromáticos policíclicos en el aire ambiente, estableciendo una concentración máxima de Benzo[a]Pireno de 1 ng m^{-3} , señalando a este compuesto

como indicador del riesgo carcinogénico del conjunto de los hidrocarburos aromáticos policíclicos [99].

Con fecha de 12 diciembre de 2011 se aprobó la **Decisión 2011/850/UE**, relativa al intercambio recíproco de información y la notificación sobre la calidad del aire ambiente a la Comisión Europea, establece que los estados miembros facilitarán la información sobre el sistema de evaluación que debe aplicarse en el año civil siguiente respecto a cada contaminante en zonas y aglomeraciones [100].

En la **Directiva 2015/1480/CE**, de la Comisión, de 28 de agosto de 2015 se modifican varios anexos de las **Directivas 2004/107/CE y 2008/50/CE** del Parlamento Europeo y del Consejo en los que se establecen las normas relativas a los métodos de referencia, la validación de datos y la ubicación de los puntos de muestreo para la evaluación de la calidad del aire ambiente. El método oportuno para la medición de Benzo[a]Pireno es el que se describe en la norma EN 15549:2008 [101].

Exposición laboral

En España, el **Real Decreto 665/1997** del 12 de Mayo sobre la protección de trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes cancerígenos durante el trabajo, establece una serie de normas y medidas de seguridad e higiene para prevenir la exposición laboral de los trabajadores a una serie de sustancias entre las cuales figuran los hidrocarburos aromáticos policíclicos presentes en el hollín, alquitrán o la brea de hulla [102].

En general los niveles de referencia en el ambiente laboral se determinan mediante diversos indicadores. Algunos de ellos son por ejemplo el límite de exposición permisible (*permissible exposure limits, PEL*), los límites de exposición recomendados (*recommended exposure limits, REL*), o los valores límite umbral (*threshold limit values, TLV*). Está claro que las concentraciones medidas en el aire del ambiente de trabajo pueden variar, pero se dan referidas a una jornada de trabajo, en general tomada como 8 horas, lo que se conoce como promedio temporal ponderado (*time-weighted average, TWA*).

Para los PAHs, el estándar químico que se ha tomado como referencia es la concentración de compuestos volátiles solubles en benceno que se desprenden por el calentamiento del alquitrán de hulla o la brea, conocida por sus siglas en inglés CTPVs (coal tar pitch volatiles, benzene-soluble fraction).

El Instituto Nacional para la Seguridad y Salud Ocupacional (*The National Institute for Occupational Safety and Health, NIOSH*) de los EEUU ha establecido un límite de exposición ocupacional recomendado como concentración promedio ponderado de tiempo (REL-TWA) para los productos de alquitrán de hulla (medidos como CTPVs) de 0.1 mg m^{-3} en una jornada laboral de 10 horas, durante una semana de trabajo de 40 horas.

También en los E.E.U.U., la Administración de Seguridad y Salud Ocupacionales (*Administration of Occupational Safety and Health, AOSH*) ha establecido un límite de cumplimiento legal de 0.2 mg m^{-3} promediado durante una exposición de 8 horas. En ocasiones se dan los valores regulados para el Benzo[a]Pireno como representante de los demás PAHs, por ser el de mayor potencial cancerígeno.

La Fundación Alemana de Investigación (*Deutsche Forschungsgemeinschaft, DFG*) establece unos límites de concentración o máxima (promedio ponderado por 8 horas) para el Benzo[a]Pireno de $5 \text{ } \mu\text{g m}^{-3}$ durante la producción y carga de los hornos de coquificación, y $2 \text{ } \mu\text{g m}^{-3}$ en el resto de localizaciones.

En España el *Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT)* ha establecido el límite de exposición de $2 \text{ } \mu\text{g m}^{-3}$ para el Benzo[a]Pireno [103].



2. INHIBIDORES SELECTIVOS DE LA CICLOOXIGENASA-2 (COXIBs)

2.1. Definición, propiedades y estructura

Los anti-inflamatorios no esteroideos (*non-steroidal anti-inflammatory drugs*, NSAIDs) y los analgésicos se encuentran entre los fármacos más consumidos a nivel mundial, ya sea mediante prescripción médica o de libre consumo. Todos ellos exhiben propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas, representando un tratamiento alternativo de procesos inflamatorios como la artritis o reumatismo así como aliviando dolores cotidianos. Desde el punto de vista histórico, el primer NSAID con beneficios terapéuticos fue la aspirina (ácido acetilsalicílico) siendo el prototipo de inhibidor de la enzima ciclooxigenasa (COX). Ésta fue sintetizada de manera casual a partir del ácido salicílico, con conocida actividad analgésica. Dicha modificación en la estructura química dotó a la aspirina con la capacidad de acetilar e inactivar permanentemente la actividad de la COX [104]. La enzima ciclooxigenasa cataliza la síntesis de eicosanoides a partir de ácido araquidónico, siendo la responsable de la producción de prostaglandinas (PGs), que actúan como paso previo a la biosíntesis de prostanoides.

En 1991, se evidenció la existencia de dos isoformas de la enzima ciclooxigenasa, designadas como COX-1 y COX-2, codificadas por diferentes genes (la COX-1 se localiza en el cromosoma 9 y la COX-2 en el cromosoma 1), con estructuras químicas similares compartiendo un 60% de homología en la secuencia de aminoácidos y estándares singulares de expresión [105,106]. La diferencia más importante entre la COX-1 y la COX-2 radica en el patrón de expresión y regulación tisular. La isoforma COX-1 se expresa de forma *constitutiva* (constante) en la mayor parte de los tejidos (manteniendo el estado fisiológico de éstos, incluyendo los encargados de la protección de la mucosa gastrointestinal), en las células endoteliales, en las plaquetas, etc; mientras que la COX-2 es una enzima *inducida* responsable de la producción elevada de prostanoides en sitios de afecciones e inflamación [107,108]. En el año 2002 se descubrió un nuevo miembro de la familia de las isoformas de la ciclooxigenasa siendo identificado como la COX-3 y que está codificada por el mismo gen que la COX-1, con la diferencia de que la COX-3 retiene un intrón que no es el mismo que en la COX-1 [109].

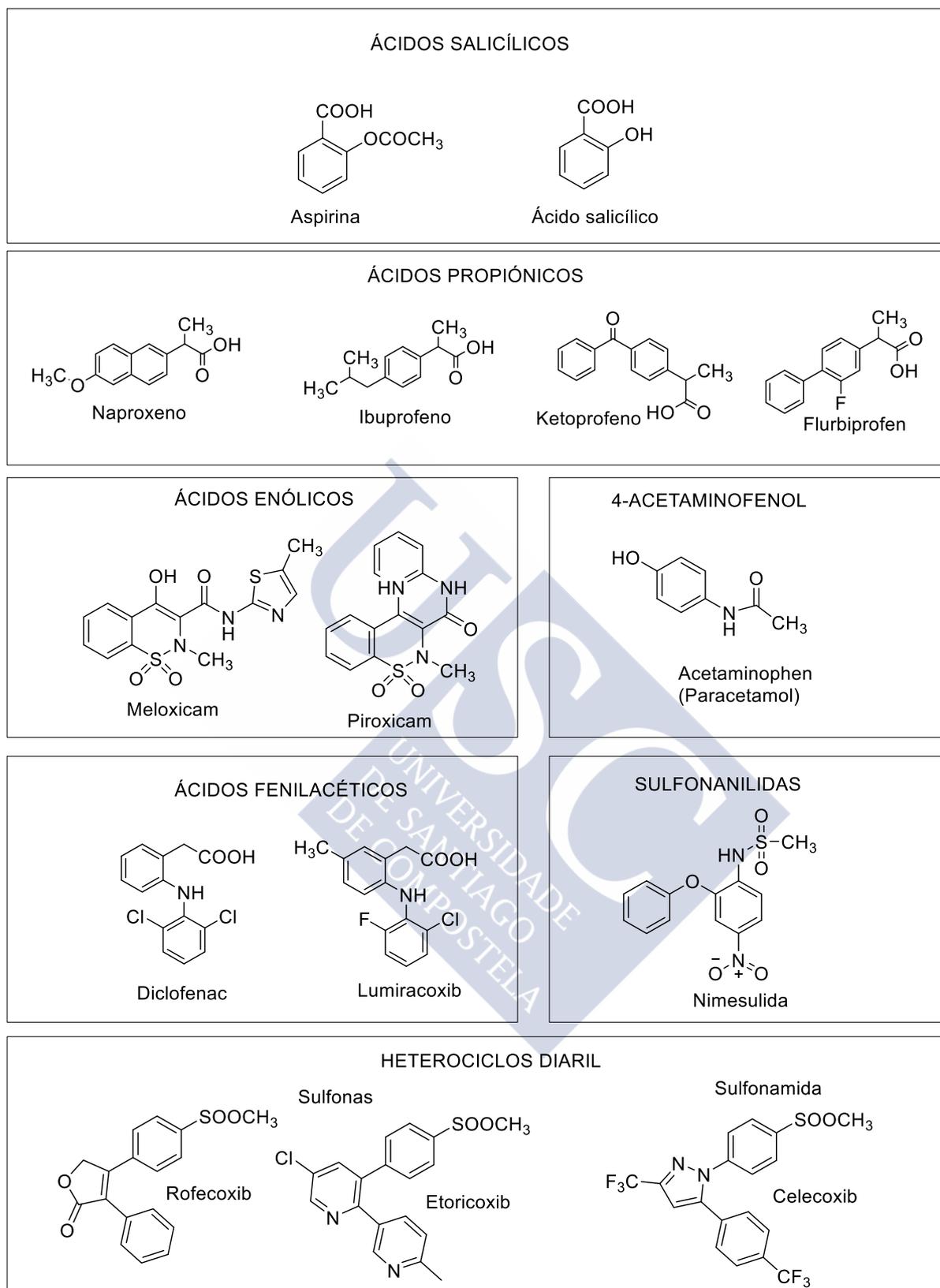


Figura II.11. Clasificación de los NSAIDs según sus estructuras químicas.

En la **Figura II. 11** se ofrece una clasificación de estos compuestos teniendo en cuenta sus estructuras químicas, no obstante, esta clase heterogénea de fármacos, se pueden clasificar también en función de su selectividad por la COX. Los NSAIDs no

selectivos son los más antiguos y se designan como tradicionales o convencionales (*tNSAIDs*), inhibiendo la actividad de la COX-1 y la COX-2. Los NSAIDs selectivos para la COX-2 se designan COXIBs [110]. Los *tNSAIDs* pueden presentar estándar de selectividad a la COX-2 similar al de los COXIBs, como es el caso del diclofenaco comparado con el celecoxib, o ser inhibidores más activos de la COX-1, como el naproxeno e ibuprofeno. La **Tabla II.8** muestra una clasificación de dichos fármacos según la selectividad sobre la enzima ciclooxigenasa.

Tabla II.8. Clasificación de los NSAIDs según su selectividad para la COX.

Antiinflamatorios no esteroideos	
No selectivos (COX-1 y COX-2)	Selectivos (COX-2)
Tradicionales	(COXIBs)
Aspirina	Rofecoxib
Acetaminofen	Valdecoxib
Indometacina	Parecoxib
Ibuprofeno	Celecoxib
Naproxeno	Etoricoxib
Sulindac	Lumiracoxib
Diclofenac	
Piroxicam	
β-Piroxicam	
Meloxicam	
Cetoprofeno	

El celecoxib y el rofecoxib pertenecen a lo que se denomina primera generación de COXIBs y fueron lanzados al mercado en 1999. Los restantes pertenecen a fármacos de segunda generación (**Tabla II.9**).

Tabla II.9. Clasificación y diferencias básicas de los coxibs [111].

Clasificación	Fármaco	Estructura química	Comercialización
Primera generación	Celecoxib	Sulfonamida	Disponible
	Rofecoxib	Sulfona	Retirado del mercado en 2004
Segunda generación	Valdecoxib	Sulfonamida	Retirado en abril 2005
	Etoricoxib	Sulfona	Disponible ^(a)
	Lumiracoxib	Derivado ácido fenilacético	Disponible ^(a,b)

^(a)No se encuentra aprobado por la Agencia de Medicamentos y Alimentos (*FDA, Food and Drug Administration*)

^(b)Retirado del mercado canadiense y australiano

Los COXIBs representan la primera clase de NSAIDs desarrollados sobre la base de una lógica mecanicista biológicamente plausible para mejorar la seguridad de la mucosa gastrointestinal y plaquetaria. Esta lógica fue sostenida mediante la validación de varios ensayos realizados a pacientes con osteoartritis y artritis reumatoide. Los resultados demostraron que el riesgo de desarrollar problemas gastrointestinales se reducían entre la mitad y dos tercios en pacientes tratados con altas dosis de inhibidores selectivos de la COX-2, comparando los resultados con pacientes que consumían altas dosis de ibuprofeno o naproxeno (fármacos que actúan de manera más potente inhibiendo la COX-1 que la COX-2) (**Figura II.12**).

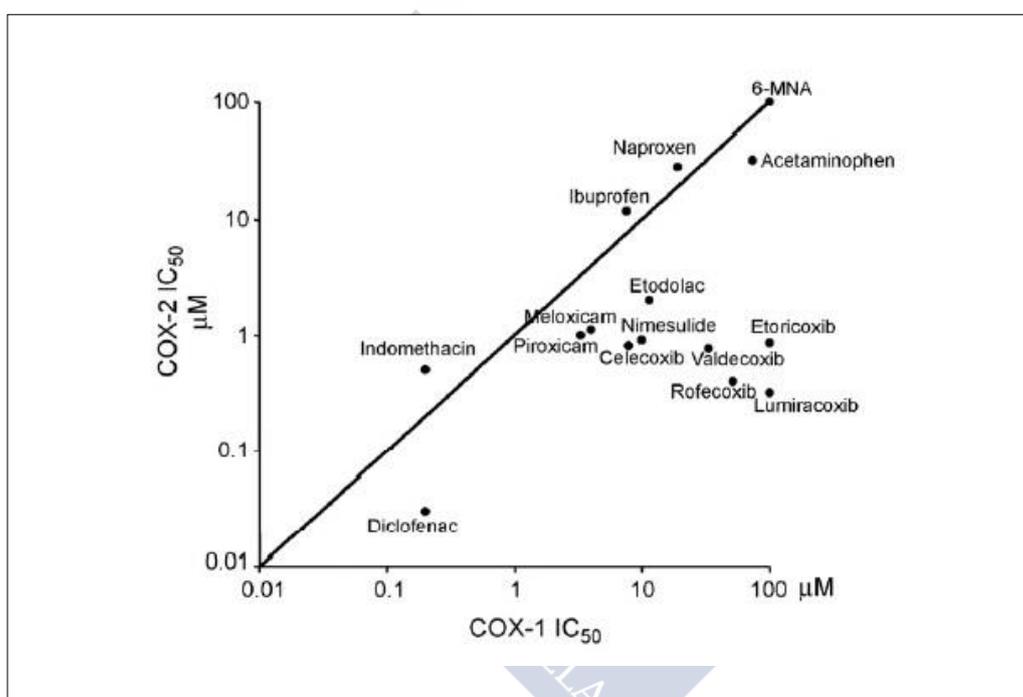
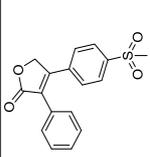
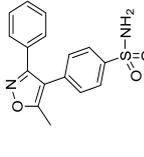
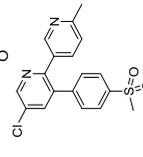
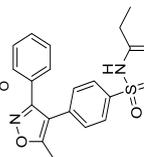
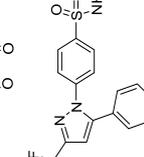
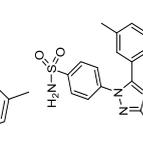


Figura II.12. Concentración necesaria de varios fármacos para inhibir la actividad plaquetaria de la COX-1 y la COX-2 al 50% (IC₅₀) en ensayos sanguíneos en humanos. Cada punto simboliza la media de 3 ó 4 valores. Los fármacos que se sitúan debajo de la línea diagonal de equivalencia son más potentes inhibiendo la COX-2 que los que se sitúan por encima de ella. Datos proporcionados por C. Patrono y col. [112]

En la **Tabla II.10** se recogen las propiedades físico-químicas de los 6 COXIBs considerados en la presente Tesis, puesto que son un parámetro importante para poder comprender el comportamiento de ellos en las diferentes matrices medioambientales. Se puede observar que los valores del logaritmo de la constante de partición octanol/agua ($\log K_{ow}$) oscilan entre -0.3 y 4, esto nos indica que algunos de los compuestos presentan un carácter más hidrófobo, como puede ser el rofecoxib, que otros como el parecoxib que se comporta como una sustancia con características polares.

Tabla II.10. Propiedades físico-químicas y estructuras de los COXIBs estudiados.

Compuesto	Nº CAS	Estructura	Fórmula molecular	Peso Molecular (uma)	Punto de ebullición (°C)	log Kow	PV (Torr)
Rofecoxib (RFC)	162011-90-7		$C_{17}H_{14}O_4S$	314.36	577	-0.339±0.469	2.42×10^{-13}
Valdecoxib (VDC)	181695-72-7		$C_{16}H_{14}N_2O_3S$	314.36	481	3.565±0.624	2.03×10^{-09}
Etoricoxib (ETC)	202409-33-4		$C_{18}H_{15}ClN_2O_2S$	358.84	510	2.455±0.420	5.17×10^{-10}
Parecoxib (PRC)	198470-84-7		$C_{19}H_{18}N_2O_4S$	370.42	-	4.330±0.602	-
Celecoxib (CLC)	169590-42-5		$C_{17}H_{14}F_3N_3O_2S$	381.37	529	2.593±0.696	2.81×10^{-11}
2,5-Dimetilcelecoxib (2,5DMCLC)	457639-26-8		$C_{18}H_{16}F_3N_3O_2S$	395.40	516	3.120±0.696	8.76×10^{-11}

K_{ow}, Coeficiente de partición octanol-agua; PV, presión de vapor a 25°C

2.2. SÍNTESIS

2.2.1. Anti-inflamatorios no esteroideos modificados

Una estrategia interesante es la posibilidad de modificar algunos tNSAIDs en inhibidores selectivos de la COX-2. La indometacina, el zomepirac, el diclofenac y algún otro NSAID han sido elaborados de manera exitosa como inhibidores selectivos de la COX-2. La farmacéutica Novartis describió la conversión de diclofenaco en lumiracoxib (**Figura II.13**). Entre los NSAIDs estudiados en los últimos tiempos, la estructura de la indometacina parece ser la más flexible en dar lugar a la formación de inhibidores específicos de la COX-2, mediante la manipulación de los grupos funcionales [113].

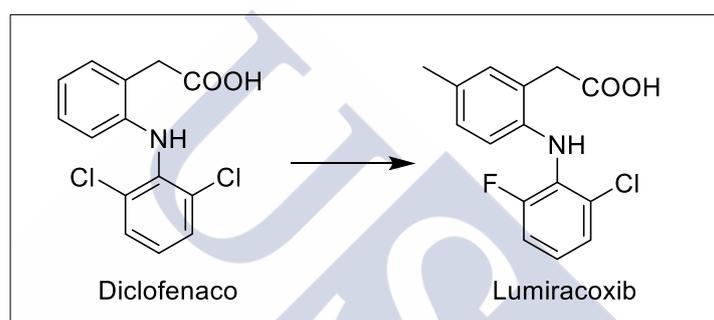


Figura II.13. Conversión del Diclofenaco en Lumiracoxib.

Es importante destacar que la metodología empleada en la modificación de estos NSAIDs no sigue un esquema general. Se han llevado a cabo varios intentos para cambiar la selectividad de la enzima COX-1 de la indometacina a la COX-2 manteniendo la eficacia al mismo nivel y reduciendo los efectos secundarios no deseados al mismo tiempo. En principio, la estrategia consiste en introducir sustituyentes largos que encajen en el volumen de los sitios activos de la COX-2 [114].

2.3. MECANISMO DE ACCIÓN

Los NSAIDs actúan inhibiendo la síntesis de prostanoideos, una familia de lípidos bioactivos que interacciona con receptores de membrana específicos de la gran familia receptores acoplados de la proteína-G (*G-protein coupled receptors, GPCRs*), y juega importantes papeles en muchas respuestas celulares así como en varios procesos fisiopatológicos, como la modulación de la reacción anti-inflamatoria y su resolución, la citoprotección gastrointestinal y ulceración, angiogénesis y cáncer, hemostasis y

trombosis, hemodinámica renal y la progresión de la enfermedad renal, arterioprotección y la progresión de la arterioesclerosis [115,116].

2.3.1. Metabolismo

La mayoría de los NSAIDs son ácidos débiles, con valores de pK_a situados en el rango de 3 a 5 (ácidos de fuerza media). Las moléculas de dichos anti-inflamatorios pueden contener grupos hidrofílicos (grupos carboxílicos o enólicos) y/o grupos lipofílicos (anillos aromáticos, átomos de halógenos). De acuerdo con su carácter ácido, los NSAIDs están presentes en el jugo gástrico de forma protonada y en el intestino delgado se dan condiciones favorables para la absorción de ácidos débiles. Para el caso del plasma también se pueden encontrar en formas ionizadas, pero por el contrario, la distribución de estos fármacos en tejidos es pobre [117].

La gran mayoría de los NSAIDs son metabolizados en el hígado mediante la oxidación y conjugación a metabolitos inactivos, los cuales son comúnmente excretados en la orina, aunque algunos fármacos son parcialmente excretados en la bilis. Se puede dar la situación en la que en ciertos estados de un proceso de enfermedad, el metabolismo sea anormal y se produzca acumulación de los NSAIDs incluso manteniendo una dosis normal de consumo [118].

Los COXIBs son compuestos relativamente lipofílicos, aunque el parecoxib (profármaco del valdecoxib) es altamente soluble en agua. Poseen estructuras químicas diferentes que pueden ser las responsables de las diferencias existentes en las propiedades farmacocinéticas. Su farmacocinética y características metabólicas se encuentran esquematizadas en la **Tabla II.11**.

Tabla II.11. Características farmacocinéticas de los COXIBs. Datos recogidos del estudio de S. Shi [111] y R.A. Halpin [128].

Parámetro	Compuesto			
	Celecoxib	Etoricoxib	Lumiracoxib	Rofecoxib
t_{max} (h)	2-4	0.2-2.0	2.5-4	9
Biodisponibilidad oral (%)	20-40	83-100	74-90	100
$t_{1/2}$ (h)	11-16	19-32	5-8	17
f_e (%)	<3	<1	3.3	<1
Metabolismo hepático	CYP2C9	CYP3A4	CYP2C9	
Excreción de metabolitos	Renal (27%) + fecal (58%)	Renal (70%) + fecal (20%)	Renal (54%) + fecal (43%)	Renal (71%) + fecal (14%)

t_{max} tiempo correspondiente a la concentración máxima encontrada en plasma, $t_{1/2}$ vida media de eliminación, f_e fracción del fármaco inalterado excretado en la orina

A continuación, se adjuntan ejemplos sobre el metabolismo de algunos de los COXIBs estudiados en esta Tesis.

➤ Celecoxib

Se ha corroborado que para los humanos y las ratas, la ruta metabólica de este fármaco es similar. En estudios previos, se ha demostrado que el celecoxib administrado oralmente se adsorbe bien y aparece rápidamente en el plasma. La *fase I* de la ruta metabólica se compone de dos etapas [119,120]: en la primera el celecoxib es oxidado a hidroxicelecoxib (M3) para a continuación sufrir otra oxidación y formar el carboxicelecoxib (M2). En los humanos, estos 2 pasos son catalizados por CYP2C9* y el alcohol dehidrogenasa, respectivamente [121,122]. En la *fase II*, M3 y M2 pueden ser conjugados por el ácido glucurónico en el grupo carboxilo o en el hidroxilo para formar los glucuronidos M1 y M5, respectivamente. La uridina 5'-difosfo-glucuronosiltransferasas (UGTs) son las responsables de la glucuronización. Todos estos metabolitos son inactivos en la inhibición de la actividad de la COX-2 [123]. La **Figura II.14** esquematiza la ruta metabólica de dicho fármaco.

* Citocromo P4502C9 (abreviado como CYP2C9) es el principal encima, que en humanos está codificado por el gen CYP2C), responsable del metabolismo hepático de los anticoagulantes orales

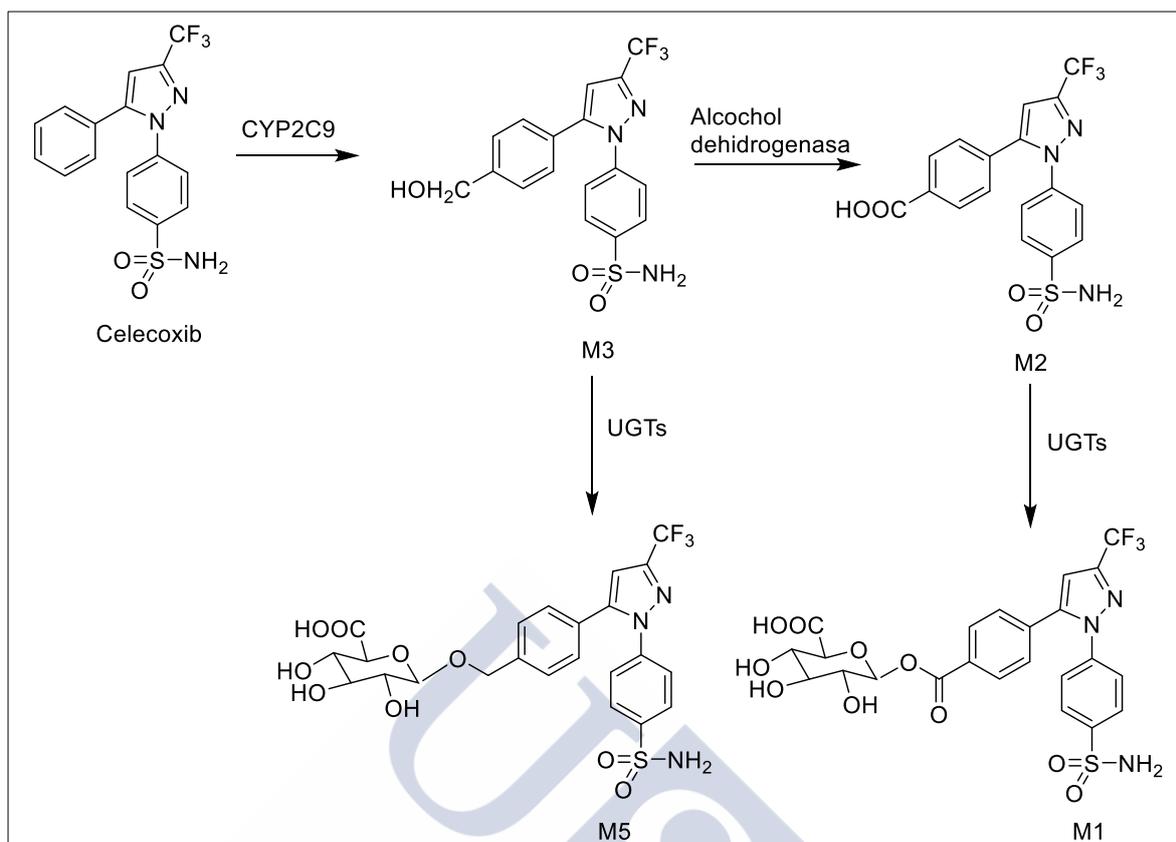


Figura II.14. Ruta metabólica del celecoxib [124].

➤ Etoricoxib

Los resultados del estudio *in vitro* sobre el metabolismo del etoricoxib indicaron que éste es metabolizado vía hidroxilación del 6'-metil y 1'-N-oxidación. Estos metabolitos no inhiben la COX-1 y no contribuyen significativamente a la inhibición de la COX-2 [125,126].

Este fármaco se adsorbe de manera rápida y la biodisponibilidad oral se aproxima al 100 %. Se ha demostrado que el etoricoxib y sus metabolitos son ampliamente metabolizados. La excreción en humanos se realiza principalmente mediante vía renal. El derivado del ácido 6'-carboxílico fue el principal metabolito excretado en orina y heces después de ingerir una dosis de 25 mg mediante vía intravenosa o 100 mg por vía oral. Menos del 1% de las dosis administradas vía intravenosa y oral fueron recuperadas intactas en la orina después de las primeras 24 horas de su administración, indicando que la excreción renal juega un papel muy pequeño en la eliminación del etoricoxib. No obstante, los metabolitos sí son ampliamente excretados a través de la orina. De hecho, el metabolito designado como 6'-Carboxi-etoricoxib es el mayoritario en muestras de orina (~80 %) analizadas después de las primeras 24

horas, y también fueron detectadas pequeñas cantidades de los 4 metabolitos restantes, incluyendo un 4 % de etoricoxib 1'-N-oxide, alrededor de un 3 % de 6'-Hidroximetil-etoricoxib, un 2 % para el 6'-Hidroximetil-etoricoxib-1'-N-Oxide y un 7 % para el derivado O-glucurónico. De forma muy similar, se encontró que el metabolito mayoritario excretado por las heces es el 6'-Carboxi-etoricoxib y alrededor de un 2 % corresponde al compuesto padre [127]. La **Figura II.15** muestra la ruta de metabolización de dicho fármaco.

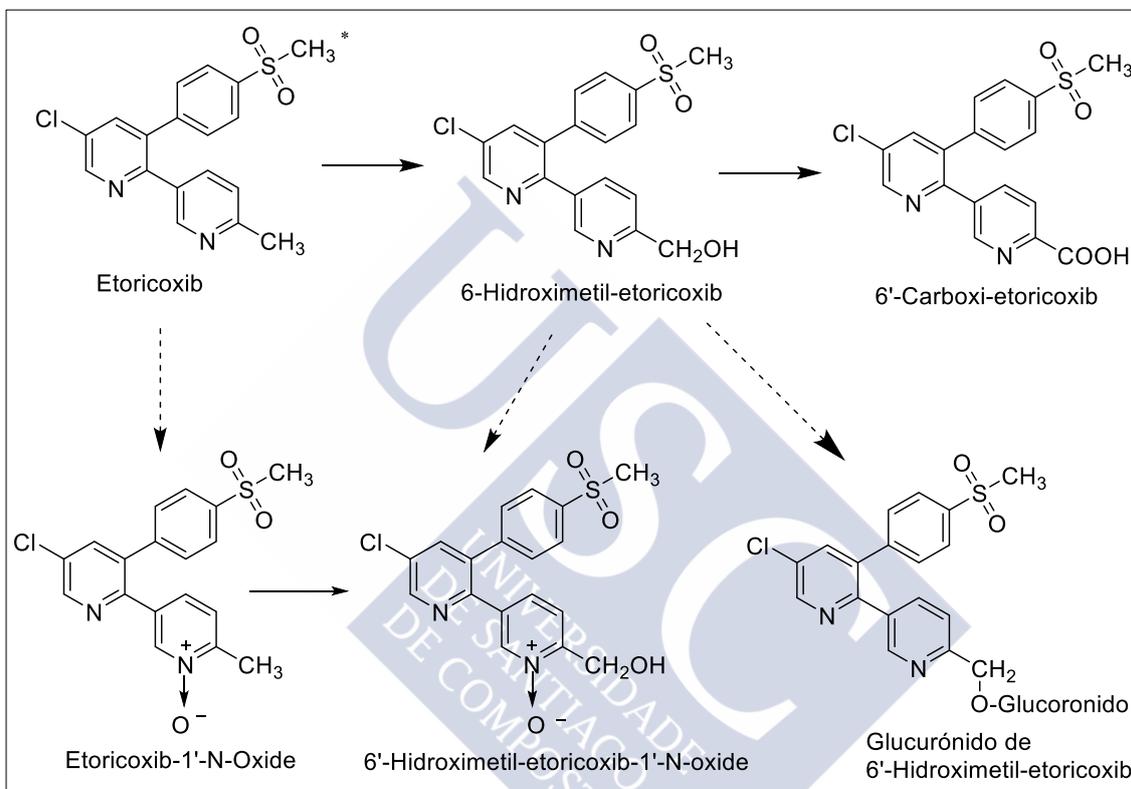


Figura II.15. Ruta metabólica propuesta para el etoricoxib en voluntarios humanos.

*Las flechas con líneas continuas indican las vías principales. El asterisco en el carbono denota la designación de carbono-14

➤ Rofecoxib

El estudio realizado por Halpin y col. [128] confirma que el rofecoxib es ampliamente absorbido por el organismo humano cuando su administración es por vía oral y la mayor parte de la dosis consumida sufre procesos de metabolización, generando productos que son eliminados vía los riñones a través de la orina. Aunque una pequeña fracción de estos compuestos (~14 %) fue recuperada en las heces, la baja excreción observada en la bilis (~1.8 % de la dosis) sugiere que la recuperación fecal observada en el seguimiento de la administración oral de una dosis de 125 mg da lugar a una absorción

incompleta. Además, la biodisponibilidad del fármaco cuando se consideran las dosis en formato pequeño (12.5 y 25 mg) ha sido del 100 %, indicando que a altas dosis la absorción es incompleta, posiblemente debido a su baja solubilidad en agua. Las estructuras de los metabolitos en los test de orina realizados en muestras de origen humano están representadas en la **Figura II.16** reflejando rutas de oxidación y reducción en los procesos de biotransformación, junto con procesos de hidrólisis y conjugación. La oxidación del anillo fenil da lugar a pequeñas cantidades de 4'-fenol (excretado como su conjugado glucurónico) y el 3',4'-dihidrodiol. Sin embargo, los productos obtenidos de la reducción metabólica del anillo 2-furanona, los cuales son excretados como derivados ácidos del anillo hidroxilabierto eritro- y treo-DHHA, representan los principales metabolitos del rofecoxib en humanos, mientras que las correspondientes lactonas cis- y trans- fueron observadas cuando los extractos de orina fueron sometidos a un ácido mineral. La reducción del doble enlace 3,4-carbono-carbono del rofecoxib, la cual teóricamente puede ocurrir tanto antes como después de la apertura hidrolítica de la estructura 2-furanona, probablemente refleja la presencia de un grupo funcional carbonilo α,β -insaturado en la estructura padre, ya que han sido descritos ejemplos de reducciones con enlaces dobles C=C para otros grupos carbonilo conjugados [129,130].

Finalmente, muy pequeñas cantidades del metabolito 5-hidroxirofecoxib y su glucurónido conjugado fueron excretadas en orina y/o heces humanas. Esta observación está relacionada con el hecho de que el 5-hidroxirofecoxib puede ser reducido de nuevo a su precursor in vivo [131].

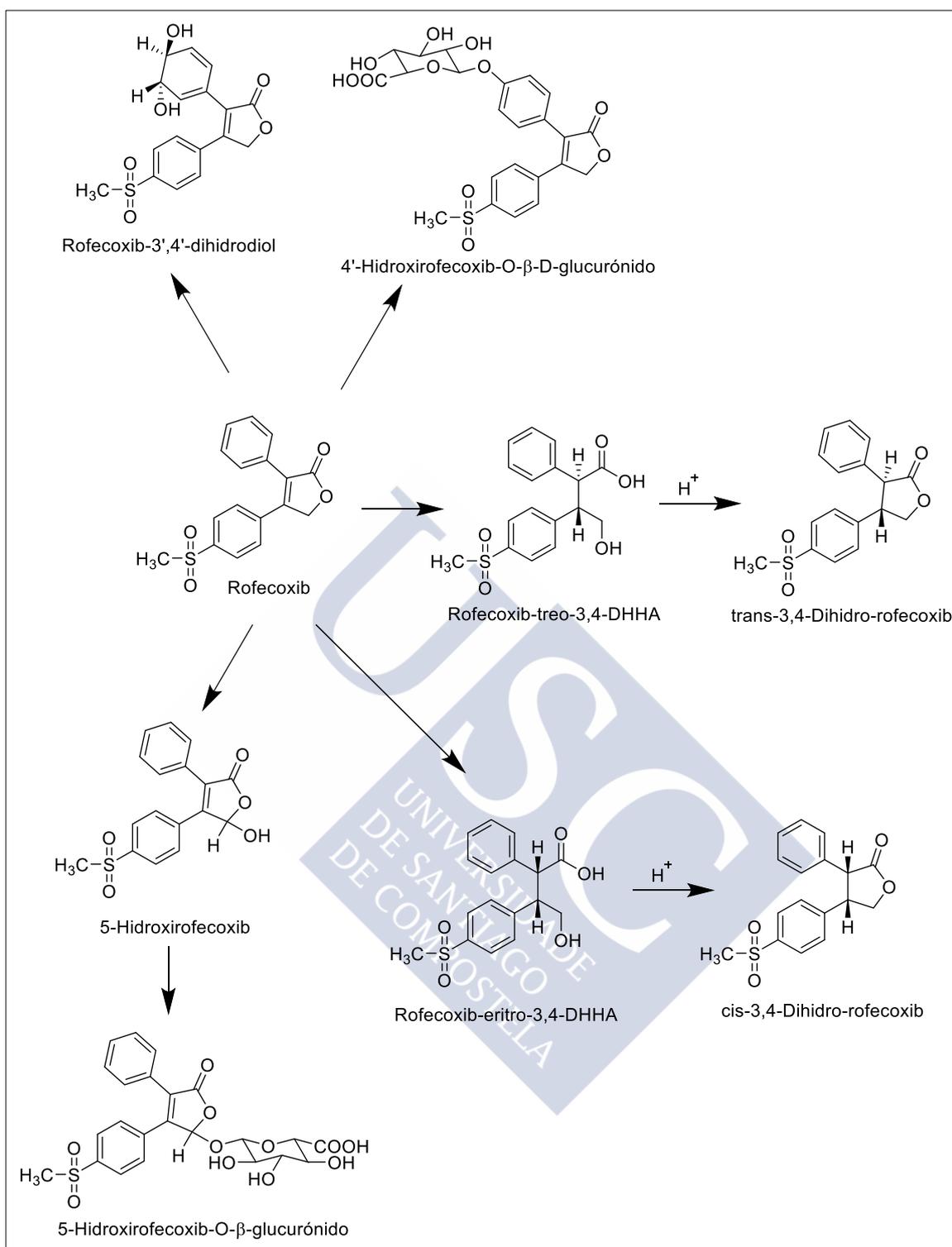


Figura II.16. Esquema representativo del metabolismo del rofecoxib en humanos.

*La estereoquímica absoluta no ha sido determinada para el ácido dihidrohidroxi (DHHA) presente en los metabolitos ni para sus correspondientes lactonas cis- y trans-3,4-dihidrorofecoxib

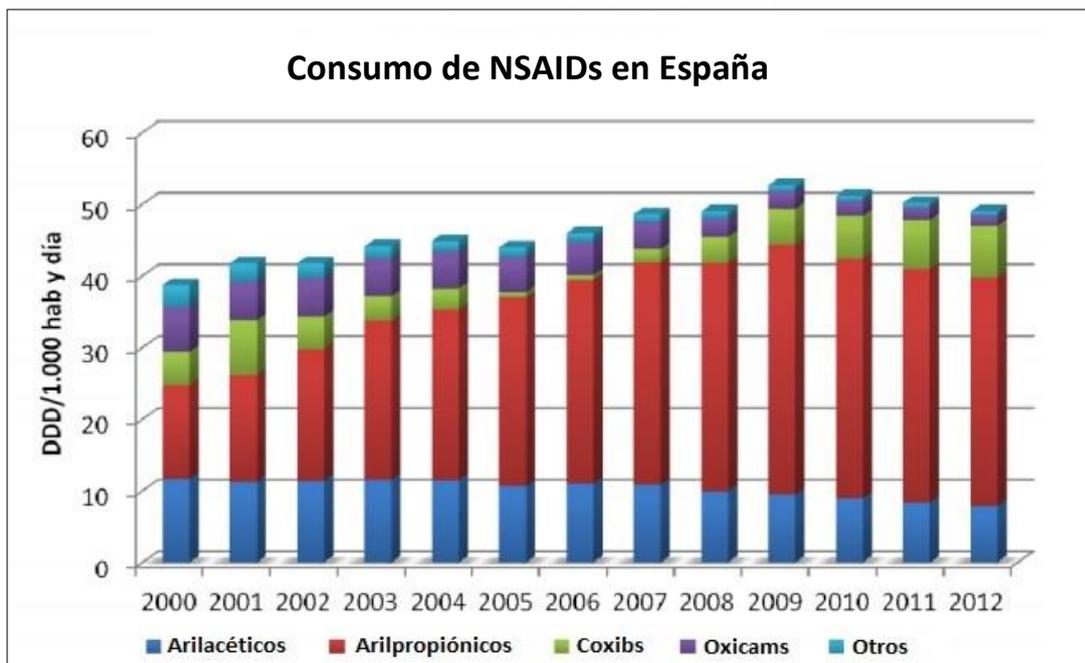
2.4. CONSUMO

Antes de reflejar datos de consumo es importante señalar la medida que se toma para evaluar la ingesta de fármacos. La Dosis Diaria Definida (Daily Dose Defined, DDD) por 1000 habitantes y por día, es decir, en Dosis Habitante Definida (DHD); se corresponde con la unidad técnica de medida y comparación que equivale a la dosis media diaria de mantenimiento en adultos de un medicamento cuando se emplea en su indicación principal, por una vía de administración determinada, y normalmente expresada en cantidades (g, mg, etc.) de principio activo [132]. Es importante destacar que la DDD es una unidad de medida y no refleja necesariamente la dosis diaria recomendada o prescrita, es decir, que los datos sobre el consumo de fármacos sólo dan una estimación aproximada del consumo y no una imagen exacta del uso real [133]. Para su cálculo se utiliza la siguiente fórmula [134]:

$$N^{\circ}DDD/1000hab/día = \frac{mg \text{ fármaco/año}}{DDDmg \times 365días \times N^{\circ}habitantes} \times 1000$$

En el informe de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) con respecto a la utilización de NSAIDs en España, el uso a nivel global en el ámbito extra-hospitalario ha experimentado un crecimiento muy significativo en el período comprendido entre 1992-2006, que pasó de 26.30 dosis/1000 habitantes/día (DHD) en el año 1992 a 45.81 DHD en el 2006. Como dato adicional, el subgrupo de los derivados arilpropiónicos (ibuprofeno, naproxeno, etc.) sufrió un incremento en su consumo, siendo el ibuprofeno el NSAID más empleado en los últimos años (46 % del consumo de NSAIDs en España durante el 2006).

Si consideramos el consumo entre el período que va desde el año 2000 hasta el 2012, en España de NSAIDs ha pasado de 38.7 DHD en el primer año de este período a 49 DHD registradas en el 2012, como así lo muestra la **Figura II.17**.



*Otros incluye: fenamatos, indolacéticos, pirazononas, salicilatos y el grupo "otros AINE"

Figura II.17. Consumo total de AINEs en España durante el período 2000-2012.

En términos absolutos, los derivados arilpropiónicos son los más empleados a lo largo del período, representando el 65.1 % del consumo de NSAIDs en 2012.

El empleo de los inhibidores selectivos de la COX-2, tras su introducción en el mercado, ha experimentado un crecimiento realmente importante hasta el año 2001, cuando se alcanzó un consumo de 7.46 DHD (de un total de 41.41 DHD de NSAIDs), aunque en los siguientes años se produjo un descenso considerable registrándose un consumo de 0.64 DHD en 2006 [135]. Hay que destacar que en el período que va desde el 2000 al 2012 el consumo de estos fármacos ha fluctuado. En el primer año de esta serie (2000-2001), el empleo de celecoxib y rofecoxib aumentó de 4.4 DHD a 7.6 DHD y descendió hasta 3 DHD en 2004, cuando se retiró el rofecoxib por motivos de seguridad [136]. En el año 2005 se comercializa etoricoxib y ya en el año 2006 el consumo de COXIBs (celecoxib y etoricoxib) se incrementa, alcanzando 7.2 DHD en el 2012, representando el 14.7 % del consumo total de NSAIDs en dicho año. En la **Figura II.18** se ve reflejado gráficamente lo anteriormente mencionado.

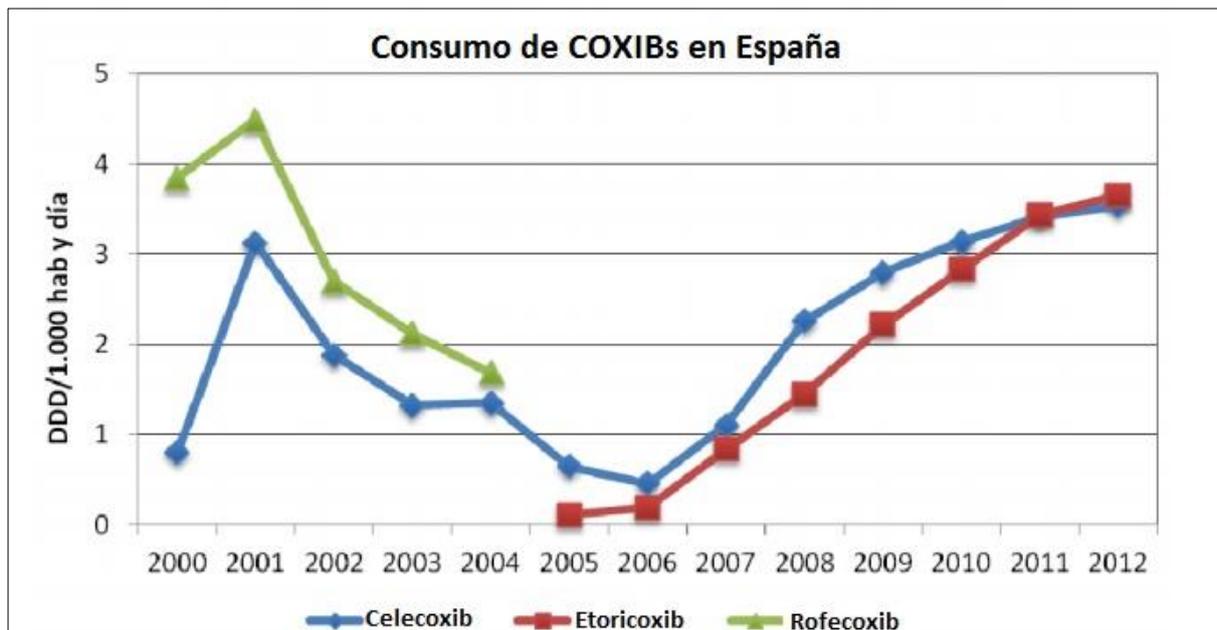


Figura II.18. Consumo de COXIBs en España durante el período 2000-2012.

Recientemente, la preocupación en relación a la seguridad cardiovascular (Cardiovascular Safety, CS) de los COXIBs ha sido elevada, particularmente el incremento de riesgo en casos de problemas trombóticos [por ejemplo, infarto de miocardio (MI), angina de pecho, muerte súbita] [137,138]. Debido al inminente y creciente riesgo, las compañías distribuidoras del rofecoxib y del valdecoxib retiraron sus productos del mercado, en septiembre de 2004 y en abril de 2005, respectivamente. Actualmente, los datos epidemiológicos registrados sugieren que los COXIBs y los *tNSAIDs* poseen en cierto grado un riesgo potencial relacionado con patologías cardiovasculares, concretamente cuando estos fármacos son ingeridos en dosis elevadas durante períodos de tiempo prolongados. Es por esto que los riesgos asociados a problemas cardiovasculares y los beneficios gastrointestinales de los COXIBs deben ser cuidadosamente sopesados antes de tomar decisiones terapéuticas, teniendo presente el sobrepeso y la co-medicación de cada paciente [111].

Comparación de gastrolesividad inducida por diferentes NSAIDs

En el año 2010, Elvira Maso y col. [139], perteneciente al Centro Español de Investigación Farmacoepidemiológica, publicaron un estudio en el que se comparaba la variabilidad entre diferentes NSAIDs y el riesgo de hemorragia digestiva. Las conclusiones principales a las que llegaron fueron las siguientes: (a) los t-NSAIDs y los

COXIBs aumentan el riesgo de hemorragia o perforación gástrica, aunque la magnitud es diferente (mayor para el caso de los anti-inflamatorios tradicionales, hasta 2 veces superior a los COXIBs), (b) la inhibición (superior al 80%) de ambas isoenzimas de la COX (COX-1 y COX-2) se asoció a un mayor riesgo y (c) los NSAIDs con una semivida de eliminación prolongada y cuyas formulaciones de liberación retardada se asociaron a un riesgo más alto que los NSAIDs con semivida de eliminación más corta. En la **Figura II. 19** se muestra para algunos NSAIDS un perfil de seguridad gástrica muy desigual, donde se puede observar que tanto el ketorolaco como el piroxicam son los más gastrolesivos.

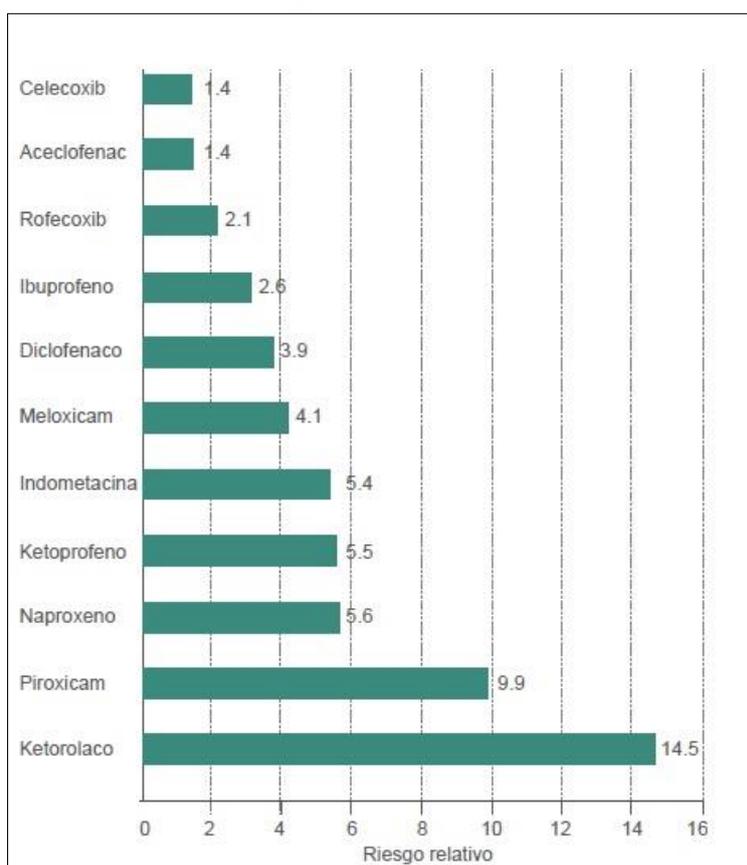


Figura II.19. Comparación de riesgo de hemorragia digestiva alta inducida por NSAIDs. Gráfico realizado por T.J. Oscanoa-Espinoza [140] a partir de los datos de E. Maso y col. [139].

Seguridad cardiovascular de NSAIDs

En el 2011 S. Trelly y col. [141] del Instituto de Medicina Social y Preventiva de la Universidad de Berna, Suiza, publicaron un estudio sobre la seguridad cardiovascular de los NSAIDs. Se llevaron a cabo ensayos donde los pacientes fueron sometidos de

manera aleatoria al suministro de naproxeno, ibuprofeno, diclofenaco, celecoxib, etoricoxib, rofecoxib, lumiracoxib y placebo. El resultado más destacado fue que existen diferencias significativas de la seguridad cardiovascular entre los NSAIDs, siendo el naproxeno el que presenta menor riesgo.

McGettigan y col. [142] realizaron también una revisión sobre el riesgo cardiovascular de los NSAIDs, donde el etoricoxib mostraba el mayor riesgo cardiovascular, seguido del etodolac, el etoricoxib, a continuación el diclofenaco, y los detectados con menor riesgo fueron el ibuprofeno y el naproxeno.

2.5. ANTI-INFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS EN EL MEDIO AMBIENTE

Los compuestos farmacéuticos se han convertido en contaminantes medioambientales emergentes que causan gran preocupación debido a su actividad biológica intrínseca, la cual puede causar efectos adversos tanto en ecosistemas acuáticos como terrestres, particularmente a exposición continuada. Los fármacos acceden a las plantas de tratamiento de agua residual (*Wastewater Treatment Plants*, WWTPs) a través de la excreción y la disposición de los mismos [143].

Los compuestos farmacéuticos no son completamente eliminados durante el tratamiento realizado a las aguas, y como resultado, éstos se descargan en las corrientes receptoras [144,145] y pueden terminar en suelos cuando el lodo generado en las plantas depuradoras es empleado como fertilizante [146,147]. La eliminación de estas sustancias en las WWTPs se evalúa normalmente como un balance de masa entre las concentraciones existentes de las aguas de influente y las de efluente [148,149]. Se utilizan dos procesos principalmente para la eliminación de los compuestos farmacéuticos: la biodegradación y la absorción en lodos. Una determinación precisa de la cantidad de biodegradación resulta extremadamente difícil debido al gran número de productos de transformación, muchos de ellos metabolitos bioactivos, la mayoría de ellos desconocidos [147] que se pueden acumular en sedimentos, lodos y suelos y de esa forma inducir efectos adversos en los organismos terrestres. La adsorción en lodos depende de las propiedades físico-químicas de los compuestos y de las características de los lodos procedentes de la depuración.

Existen numerosos estudios que evalúan la presencia de anti-inflamatorios no esteroideos en el medioambiente, pero la mayoría de ellos están centrados en la detección y determinación de los más consumidos a nivel mundial, como pueden ser el diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno y/o ketoprofeno [150,151]. En una de las revisiones más completas hasta la fecha hecha por P. Verlucchi y col. [152] se encuentran una relación de 118 compuestos, pertenecientes a 17 clases terapéuticas diferentes, detectados en aguas de influente y efluente urbano. Como ya se ha comentado, los procesos de tratamiento tradicionales no están diseñados para eliminar estos fármacos y se observaron concentraciones que oscilan entre los ng L^{-1} a los $\mu\text{g L}^{-1}$ en efluentes procedentes de plantas de tratamiento de aguas de lugares como Canadá [153], España [154], Portugal [155], Suecia [156], Alemania [152] o Francia [157].

En cuanto a los compuestos anti-inflamatorios seleccionados en esta Tesis, no se ha encontrado referencias bibliográficas citando métodos de determinación de COXIBs en matrices medioambientales. La novedad que aporta esta Tesis es precisamente el desarrollo de un método de determinación para dichos compuestos en diferentes matrices medioambientales, concretamente en aguas y lodos de depuradora.

Por otro lado, los inhibidores selectivos de la COX-2 sí se han estudiado en otro tipo de matrices, como por ejemplo en leche (celecoxib, rofecoxib y firocoxib, entre otros NSAIDs) [158] o en plasma humano donde O. Cheremia y col. [159] validaron un método para la determinación de lumiracoxib o H. Jiang y col. [160] donde desarrollaron un método de extracción líquida en soporte (Supported Liquid Extraction, SLE) para matrices de plasma haciendo la determinación mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas para la evaluación de 10 compuestos farmacéuticos, siendo uno de ellos el celecoxib.







II.A. PREPARACIÓN DE MUESTRA

3. PREPARACIÓN DE MUESTRA: TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN PARA LOS ANALITOS ESTUDIADOS

La preparación de muestra se compone de una serie de pasos necesarios para modificar o convertir la muestra en una forma adecuada para realizar su análisis. Este proceso se puede dividir en varias subetapas (aunque no siempre es preciso realizarlas todas) que comprenden la disolución de la muestra, la filtración, el ajuste de pH, la extracción de un analito de una matriz compleja, la evaporación y/o la concentración de analitos, la eliminación o enmascaramiento de especies interferentes, etc [161].

El objetivo principal de este proceso no es sólo alcanzar extracciones altamente selectivas y eficientes de los analitos de interés, cuyos límites de detección (*limits of detection, LODs*) e interferencias de matriz sean muy bajos (lo cual no es una tarea fácil en muchos casos), sino que además se busca un desarrollo de método rápido y con bajo consumo de reactivos y disolventes, manteniendo la seguridad del operador [162].

Del mismo modo, la monitorización de compuestos a niveles traza o ultra-traza presentes en las muestras normalmente requieren un paso previo de aislamiento y/o enriquecimiento de los analitos ya que las técnicas analíticas no son lo bastante sensibles para la determinación de compuestos traza en matrices complejas. Viendo esto, cabe señalar que los objetivos principales de las técnicas de separación de muestra son [163]:

- Preconcentración de analitos a un nivel superior al límite de detección del instrumento analítico.
- Aislamiento de los analitos de la matriz original y/o simplificación de la matriz.
- Eliminación de interferencias y constituyentes de la matriz que son fuertemente adsorbidos en la columna cromatográfica.

3.1. Muestras líquidas

En el pasado, la extracción líquido-líquido (*liquid-liquid extraction, LLE*), fue la técnica más popular para la extracción de compuestos orgánicos en matrices acuosas y medioambientales, aunque el uso de grandes cantidades de disolventes, la lentitud y laboriosidad de su desarrollo, y la necesidad de mejorar las recuperaciones ha llevado

a esta técnica a ser desplazada en favor de la extracción en fase sólida (*solid phase extraction, SPE*), que ha experimentado importantes desarrollos en términos de formatos, automatización, etc., así como la extracción sorptiva con barras agitadoras (*stir bar sorptive extraction, SBSE*) o la microextracción en fase sólida (*solid-phase micro-extraction, SPME*) [164].

En esta sección se describirá la técnica de SPE como ejemplo de una técnica de extracción exhaustiva y la técnica de (micro)extracción basada en el equilibrio que usa un extractante sólido (extracción mediante absorción sobre barras agitadoras, ab/adsorción con polímeros de bajo coste) como ejemplo de técnica de extracción no exhaustiva.

3.1.1. Extracción en fase sólida

Actualmente, la extracción en fase sólida es sin duda el método de preparación y tratamiento de muestras más explotado para matrices acuosas. Se introdujo a mediados de los años 70 como alternativa a la LLE ofreciendo un número importante de características ventajosas sobre ésta, como por ejemplo, mayores factores de enriquecimiento, mejores recuperaciones, rápida separación de fases con ausencia de emulsiones, bajo coste y mayor facilidad para el acoplamiento a técnicas de detección [165].

El principio de esta técnica se basa en la inmovilización física o adsorción de los analitos en una superficie de soporte sólido específica y selectiva para la posterior elución de los mismos mediante el empleo de disolventes. La elección o preferencia del soporte sólido se basa normalmente en las propiedades físico-químicas de los compuestos de interés para que éstos queden retenidos en el soporte y los otros componentes interferentes de la muestra pasen a través de él.

La SPE ofrece la ventaja de una elevada sensibilidad permitiendo realizar de manera simultánea la extracción, limpieza y concentración de los analitos. A continuación, en la **Figura II.A.20** se describen las etapas de las que consta la técnica:

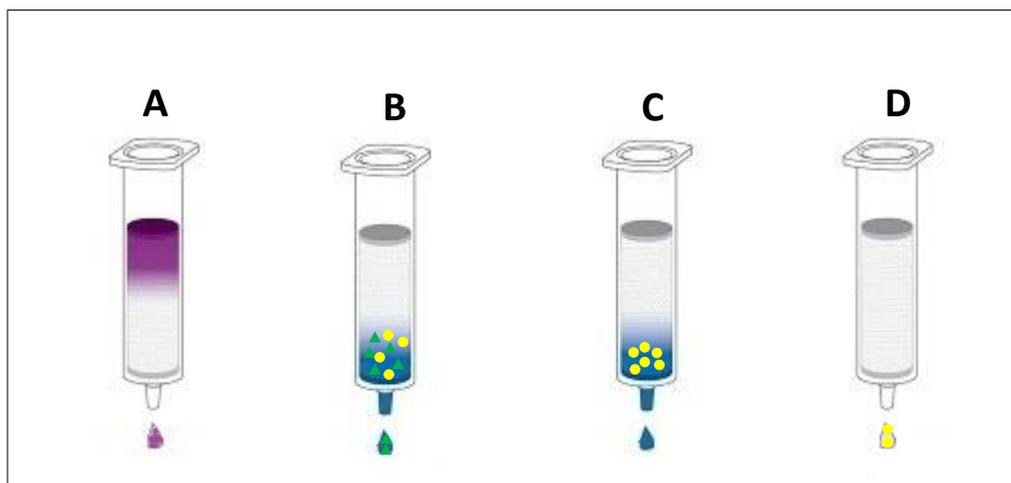


Figura II.A.20. Etapas que involucran el proceso de extracción mediante la SPE.

Etapa A: se corresponde con el acondicionamiento de la fase estacionaria para que se encuentre solvatada, de manera que ésta puede interactuar mejor con la muestra.

Etapa B: la muestra con los analitos e interferencias se pasa a través del adsorbente, en caso de ser pequeños volúmenes se puede hacer mediante vacío, o por el contrario aplicando presión con la ayuda de una bomba de vacío. El adsorbente retiene selectivamente a los analitos y alguna interferencia, otras pasan sin ser retenidas.

Etapa C: en la etapa de lavado se limpia el adsorbente con un disolvente selectivo, es decir, con gran afinidad por las interferencias y muy poca por los analitos que permanecen en el lecho adsorbente.

Etapa D: los analitos concentrados y purificados son eluidos del adsorbente, siendo la elución lo más selectiva posible empleando disolventes por los que los analitos tengan gran afinidad.

La SPE también es muy popular debido a su facilidad a la hora de trabajar en combinación con diferentes técnicas: *on-line* y *off-line*. Cuando el proceso se realiza mediante la técnica *on-line*, no existe la etapa de manipulación de muestra entre la preconcentración y el análisis, por lo que los riesgos asociados a pérdidas y contaminación son eliminados y por tanto se obtiene una mejor reproducibilidad. Del mismo modo, todas las especies son analizadas, por lo que el volumen de muestra puede ser menor que para el caso del empleo del procedimiento *off-line*, el consumo de disolventes orgánicos es menor y el potencial de automatización es más ventajoso.

A pesar de la funcionalidad y practicidad de la técnica *on-line*, la aproximación de la SPE *off-line* es todavía de gran utilidad para el análisis de muestras complejas debido a su gran flexibilidad y su habilidad para analizar el mismo extracto empleando varias técnicas. Además, los límites de detección y los factores de enriquecimiento son mejores que en el procedimiento *on-line*.

3.1.1.1. Adsorbentes

- Óxidos inorgánicos: debido a la naturaleza que presentan este tipo de adsorbentes, así como la propia naturaleza de las interacciones analito-adsorbente, el desarrollo de éstos (por ejemplo, sílice, alúmina, silicato de magnesio) se ha visto bastante limitado [164].
- Sílice enlazada: se forman por la reacción de organosilanos con sílice activada. De esta manera, se origina un adsorbente con el grupo funcional del organosilano unido al sustrato de la sílice a través de un enlace silil-éter. Dentro de este grupo nos encontramos con fases en modo reverso (la interacción entre el analito y la fase reversa tiene lugar mediante fuerzas de van der Waals, un ejemplo es el octilsilano C8 u octadecilsilano C18) o en modo normal (en este caso el mecanismo de retención es a través de interacciones dipolo-dipolo o puentes de hidrógeno, un ejemplo es el cianopropilsilano CN o aminopropilsilano NH₂) y de intercambio aniónico (se establecen interacciones electrostáticas, ejemplos de ello son el trimetilamino propilsilano SAX o bencenosulfonil propilsilano SCX).
- Adsorbentes poliméricos hidrofílicos: la funcionalidad de los polímeros porosos, basada principalmente en estireno-divinilbenceno (*styrene-divinylbenzene*, St-DVB), con funcionalidades polares se ha logrado empleando dos estrategias principales: la copolimerización de monómeros con las funcionalidades deseadas y la introducción de un grupo funcional al polímero hidrofóbico. Actualmente, el adsorbente hidrofílico-hidrofóbico comercial más empleado, obtenido por copolimerización, es el Oasis HLB de Waters (**Figura II.A.21**). Este material es un copolímero macroporoso poli(*N*-vinilpirrolidona-DVB) (PVP-DVB)

con un área superficial específica de $\sim 800 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$. Desde su comercialización, Oasis HLB ha sido muy popular en la etapa de preparación de muestra debido a las ventajas que posee: es capaz de extraer compuestos polares y apolares, presenta alta capacidad de carga, ofreciendo limpieza de matrices complejas con alta efectividad en términos de eliminación de interferencias. Otra ventaja importante es la posibilidad de trabajar en todo el rango de pH porque son más estables que las sílicas y evitan las interferencias silanólicas en los extractos.

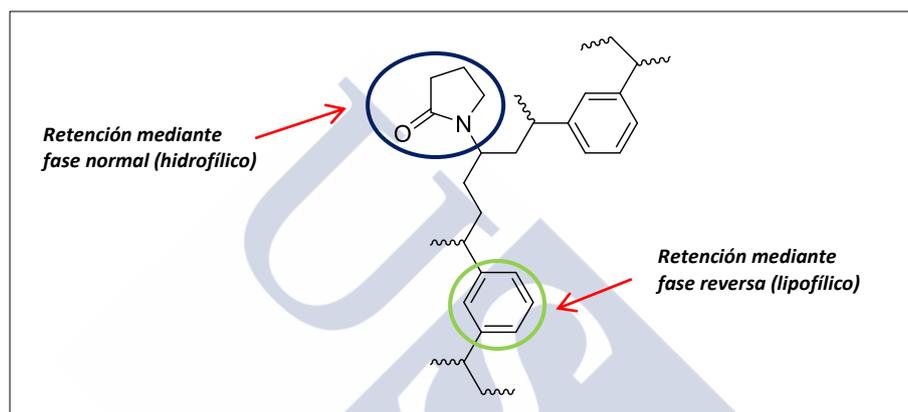


Figura II.A.21. Estructura del adsorbente Oasis HLB.

- Adsorbentes de modo mixto de intercambio iónico: con la premisa de lograr buena selectividad y capacidad en un único material, los adsorbentes de modo mixto o de fase dual han emergido en la última década permitiendo extracciones selectivas a través de mecanismos de intercambio iónico con los analitos de interés.

Inicialmente se comercializaron adsorbentes de intercambio iónico basados en sílice, sin embargo, éstos ofrecían baja estabilidad a pH extremos y baja retención de compuestos polares. A consecuencia de esto, se diseñaron nuevos adsorbentes de intercambio iónico basados en materiales poliméricos [166]. Dependiendo del tipo de interacción establecida entre estos polímeros y los analitos, los adsorbentes de modo mixto se pueden dividir en cuatro grupos principales: intercambio catiónico fuerte (*strong cation-exchange*, SCX), intercambio catiónico débil (*weak cation-exchange*, WCX), intercambio aniónico fuerte (*strong anion-exchange*, SAX) e intercambio aniónico débil (*weak anion-exchange*, WAX). Estas interacciones iónicas se consiguen

mediante la modificación de la estructura del polímero con grupos funcionales específicos como es el caso del grupo ácido sulfónico para SCX, ácido carboxílico para WCX, una amina cuaternaria para SAX, y una amina secundaria para WAX. Debido a su doble carácter, estos adsorbentes son capaces de extraer analitos cargados o neutros, mediante intercambio iónico e interacciones de fases reversa, respectivamente.

La compañía Waters fue la pionera en comercializar por primera vez este tipo de fases estacionarias: Oasis MCX (se corresponde con SCX), Oasis WCX (se corresponde con WCX), Oasis MAX (se corresponde con SAX) y Oasis WAX (se corresponde con WAX). Todos ellos están basados en el esqueleto del Oasis HLB sufriendo posteriormente una modificación química con grupos sulfónicos para SCX, ácidos carboxílicos para WCX, dimetilbutilamina para SAX y piperazina para WAX.

- Carbón grafitizado: el carbón grafitizado (*graphitized carbon blacks, GCBs*) se forma calentando el carbón a alta temperatura (2700-3000 °C). Los primeros adsorbentes eran no-porosos y tenían poca superficie específica. Es un material que extrae compuestos polares, aunque su principal inconveniente radica en la propia retención que en algunos casos es tan fuerte que resulta complicado eluir los analitos de forma eficaz.
- Adsorbentes selectivos: los primeros intentos exitosos para mejorar la selectividad se consiguieron con el desarrollo de los inmunoabsorbentes (*immunosorbents, IMSs*) y los materiales de acceso restringido (*restricted-access materials, RAMs*) como materiales específicos. Este tipo de fases se han aplicado de forma extensa en los campos de la biología y en alimentación y en menor medida en análisis medioambientales [171]. La característica fundamental es que retienen el analito de interés de forma selectiva eliminando compuestos de alto peso molecular como son las proteínas. Sin embargo presentan algunas limitaciones como el elevado coste, la inestabilidad de los IMSs y la insuficiente selectividad de los RAMs. Para resolver este

problema se aplicó el reconocimiento molecular para sintetizar nuevos y novedosos adsorbentes.

Dentro de este tipo de adsorbentes también hay que destacar los denominados polímeros de impronta molecular (*molecularly imprinted polymers, MIPs*). Esta tecnología está basada en la formación de un complejo entre el analito (plantilla) y un monómero funcional. Después del proceso de polimerización la plantilla es eliminada del polímero dejando un sitio de reconocimiento específico complementario en tamaño, forma y funcionalidad química a la molécula plantilla. El fenómeno de reconocimiento se debe a interacciones de tipo dipolo-dipolo, puentes de hidrógeno e interacciones iónicas [163]. Los MIPs presentan muchas ventajas, pero las más importantes para la aplicación a SPE son su elevada selectividad y afinidad por la molécula de interés usada en el proceso de impresión.

3.1.1.2. Formatos y dispositivos comerciales

Dada la evolución en el concepto de extracción en fase sólida de los analitos de interés, se observa un progreso significativo en el desarrollo de esta tecnología, en la que se ha incluido la simplificación, automatización y miniaturización a partir del concepto original. Actualmente, los formatos empleados en el laboratorio distan mucho del método propuesto por Braus y col. en 1951, el cual estaba basado en la introducción de carbono activo granulado (desde 1.2 a 1.5 kg) en un cilindro de hierro [167]. Tanto el formato como el tipo de material han sufrido una evolución importante en los últimos tiempos. El extenso rango de materiales disponibles permite el desarrollo de soluciones prácticas para obtener altos valores en la recuperación y en el enriquecimiento, reduciendo de manera muy significativa la cantidad de material adsorbente y el volumen de disolventes orgánicos. En la **Figura II.A.22** se adjuntan los diferentes formatos disponibles en el mercado.

- Cartuchos: estos dispositivos constituyen la configuración más tradicional y es el formato más empleado por los químicos analíticos para el aislamiento y enriquecimiento de los analitos presentes en las diferentes muestras a tratar. Los materiales de la estructura de estos cartuchos o tubos son el

polipropileno o el vidrio. Los cartuchos se rellenan con un medio adsorbente, colocado entre dos fritas de polipropileno o de acero inoxidable, que puede variar dependiendo de la naturaleza de los compuestos a separar. En el mercado existen infinidad de columnas con diferentes fases sólidas y tamaños. El volumen disponible de los cartuchos comerciales va desde valores de 1 a 60 mL. Para el caso en que el volumen de muestra es más pequeño, menor es el volumen de los cartuchos, disponiendo para este caso de 1 ó 3 mL, conteniendo desde 30 mg a 4 g de adsorbente. Para una situación en la que el volumen de muestra es muy grande se encuentran los denominados cartuchos de gran depósito (*large reservoir cartridge, LRC*), cuyos volúmenes van desde los 10 a los 150 mL con un relleno de adsorbente que puede alcanzar hasta los 75 g. En general, si se selecciona una alternativa en la que se toma una mínima cantidad de material adsorbente el resultado es que se ve reducida la cantidad de disolventes orgánicos necesarios para acondicionar, lavar y eluir, al mismo tiempo que se reduce el tiempo necesario para completar el análisis acortando o eliminando el proceso de secado del adsorbente [163].

- Discos: otro diseño de la SPE que ha ganado gran popularidad en los últimos años es la extracción empleando discos, donde las partículas del material adsorbente se encuentran embebidas en la membrana. Las características más significativas son las siguientes [168-171]:
 - ✓ La posibilidad de aumentar el flujo de la muestra, reduciendo el tiempo necesario para llevar a cabo todo el análisis.
 - ✓ El incremento de la superficie de contacto, la uniformidad y la densidad del lecho, además de reducir el riesgo de pérdidas de analito.
 - ✓ La reducción del volumen de lecho (masa de adsorbente) afecta de forma positiva resultando en una reducción de la cantidad de disolventes para la elución y acortando el tiempo de secado de los discos.

Otra ventaja interesante es que el riesgo de taponamiento debido a la materia particulada en suspensión presente en la muestra original se ve reducido. El tamaño de disco más utilizado para métodos estándar en el análisis de muestras de agua, cuyos volúmenes oscilan entre 0.5 y 1 L, es el de 47 mm [172].

- Puntas de pipeta: un ejemplo de la miniaturización de la SPE convencional es este dispositivo conocido como puntas de pipeta de SPE (*SPE pipette tips*, *SPE-PT*). El material adsorbente se encuentra empaquetado en el interior de las puntas de micropipeta. Los analitos son extraídos por aspiración repetida y desorción de la muestra empleando un solo canal o pipetas multicanal [173]. Esta técnica se gana el reconocimiento del mundo científico debido a la reducción muy significativa de la cantidad de adsorbente y disolvente orgánico empleados que reduce costes de manera considerable. Existe la posibilidad de integrar en un solo paso los procesos de extracción y purificación acortando el tiempo de análisis. Así mismo, es posible inyectar directamente el eluyente sin necesidad de centrifugar o evaporar el disolvente en un cromatógrafo de gases o líquidos.

La SPE-TP está diseñada para la extracción y concentración a micro escala, es por ese motivo que es una técnica muy popular en campos de genómica, proteómica y metabolómica para llevar a cabo la purificación y concentración de proteínas y péptidos [174]. No obstante, se han encontrado aplicaciones recientes en análisis medioambiental como por ejemplo la determinación de fungicidas en agua de grifo y zumo de uvas [175].

- Placa de SPE de múltiples pocillos: esta técnica es un buen ejemplo de la combinación entre automatización y robotización. Estas ventajas contribuyen a un mejor control de la manipulación de la muestra y del disolvente, incrementando la precisión y exactitud en comparación con los métodos manuales [172]. Se pueden encontrar tres formatos de 96, 384 y 1536 pocillos, lo que proporciona una rápida y simultánea preparación de

gran cantidad de muestras en un corto período de tiempo [173-176]. El material adsorbente se puede encontrar empaquetado de manera holgada, o bien embebido en una membrana de discos de extracción. Los platos pueden encontrarse fijos o ser móviles. Los platos fijos poseen un volumen fijo de columna y de adsorbente, mientras que en los móviles las columnas de SPE, redondas o cuadradas, de plástico pueden ser intercambiables, permitiendo el uso de diferentes tipos y cantidades de fase estacionaria conduciendo a un proceso eficiente de separación y aislamiento de los analitos en diferentes muestras durante un mismo ciclo analítico.

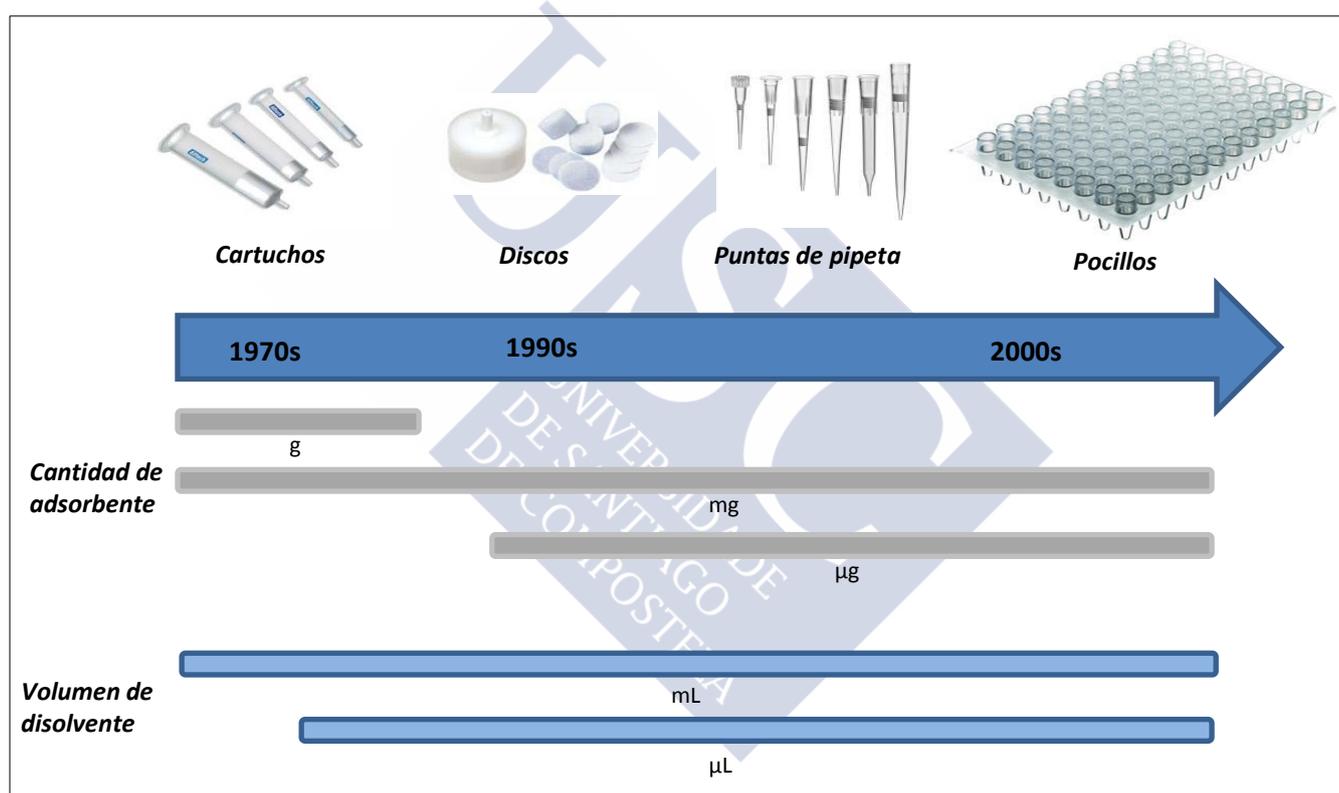


Figura II.A.22. Evolución en el desarrollo metodológico de la extracción en fase sólida.

3.1.1.3. Aplicación de la SPE en la determinación de Coxibs en muestras acuosas

La SPE es la técnica de mayor expansión para la extracción de NSAIDs en muestras acuosas [169,177-179]. Sin embargo, los inhibidores selectivos de la COX-2 no han sido analizados en este medio y como bien asevera M. Farré y col. [180] los Coxibs deberían ser incluidos en estudios futuros porque sus efectos biológicos en el medioambiente son todavía desconocidos.

Aunque hay una notoria carencia de estudios en muestras medioambientales, existen varias aplicaciones de la técnica de SPE a muestra de origen biológico, principalmente plasma (humano o animal) siendo en algunos casos acidificado. Como puede observarse en la **Tabla II.A.12**, el adsorbente más empleado para el tratamiento de muestra es la sílice ligada con C18 (mecanismo de fase reversa con cartuchos de C18 Bond Elut).



Tabla II.A.12. Determinación de COXIBs en muestras biológicas mediante SPE.

Analito	Matriz	Protocolo de extracción	Técnica de determinación	R (%)	Ref.
CLC	Plasma humano	C18 Bond Elut-SPE (3cc) Acond: 6 mL ACN, 6 mL MeOH, 6 mL H ₂ O Lav: 6 mL H ₂ O Elución: 9 mL ACN/MeOH (3:1) Extracto: 15% ACN (0.01 M NaH ₂ PO ₄) pH=4.5	LC-FL	84.4±3.6	[119]
CLC	Bilis ratón	C18 Bond Elut-SPE (3cc) Acond: 6 mL ACN, 6 mL MeOH, 6 mL H ₂ O Lav: 6 mL H ₂ O Elución: 9 mL ACN/MeOH (3:1) Extracto: 20% ACN (0.01 M CH ₃ COONH ₄) pH=4.5	LC-MS	-	[120]
	Plasma ratón (0.3 mL acidificado con H ₃ PO ₄)	Intercambiador catiónico hidrofóbico de modo mixto Acond: 2×1 mL ACN, 2×1 mL H ₂ O Elución: 1mL MeOH (0.6% NH ₄ OH) Extracto: ACN (0.01 M NaH ₂ PO ₄) pH=9	LC-FL	-	[120]
CLC	Plasma conejo (1 mL acidificado con H ₃ PO ₄)	C18 Bond Elut-SPE (1cc) Acond: 2 mL ACN, 2 mL MeOH, 2 mL H ₂ O Lav: 2 mL H ₂ O Elución: 2 mL ACN Extracto: ACN (0.025 M CH ₃ COONH ₄) pH=4.5	LC-MS/MS (RAM ^a)	87.4±4.1	[181]
VDC	Plasma humano (400 µL +400 µL P.I.)	C18 Bond Elut-SPE (1cc) Acond: 2 mL ACN, 2 mL H ₂ O Lav: 2 mL H ₂ O Elución: 250 µL ACN Extracto: ACN/H ₂ O (50:50) (0.01M CH ₃ COONH ₄)	LC-MS/MS (MRM)	-	[182]

^aRAM: Radiactive monitoring

Finalmente, se ha desarrollado un método multiresiduo para la determinación de NSAIDs en leche, dentro de los 14 compuestos estudiados 2 de ellos son COXIBs (rofecoxib y celecoxib). En la **Tabla II.A.13** se describe de forma breve y concisa la metodología seguida para la determinación de los mismos.

Tabla II.A.13. Determinación de coxibs en leche mediante SPE.

Analitos	Matriz	Protocolo de extracción	Técnica de determinación	R (%)	Ref.
RFC, CLC	Leche	SepPak aminopropil (NH ₂)(6cc) con una capa adicional de 4g Na ₂ SO ₄ Acond: 5mL ACN Elución: 5 mL ACN (5% HCOOH) Extracto: ACN + DMSO	LC-MS/MS (MRM) (QqQ) ESI (+ y -)	-	[159]

3.1.2. Extracción mediante absorción sobre barras agitadoras

La microextracción se suele definir como una técnica de extracción donde el volumen de la fase extractante es muy pequeño en relación al volumen de la muestra, en la mayoría de los casos la extracción es exhaustiva con sólo una pequeña fracción del soluto inicial siendo extraído en sucesivos análisis. La eficiencia de extracción está determinada por la partición del soluto entre la matriz de la muestra y la fase extractante [183].

En la última década, el desarrollo de nuevas y modernas técnicas de tratamiento de muestra, conducen a la simplificación, miniaturización, a la fácil manipulación de los dispositivos analíticos, así como a la reducción o ausencia de disolventes orgánicos tóxicos, y a la utilización de bajos volúmenes de muestra de acuerdo con los principios de la química analítica verde. En particular, para el análisis de trazas los métodos basados en absorción han demostrado ser una buena alternativa permitiendo la microextracción de forma directa de compuestos volátiles y semi-volátiles de casi todo tipo de matrices. Estas aproximaciones han exhibido un alto rendimiento para mejorar la sensibilidad y selectividad [184]. Por lo tanto, el muestreo pasivo, no exhaustivo o estático ha ido ganando gran aceptación en muchas áreas científicas siendo la microextracción en fase sólida (*solid-phase micro-extraction, SPME*) y la extracción mediante absorción con barras agitadoras (*stir bar sorptive extraction, SBSE*) las más empleadas.

La SBSE fue introducida en el año 1999 por Baltussen y col. [185] y está basada en los mismos principios que la SPME, sin embargo, el material extractante en lugar de encontrarse sobre una fibra de sílice fundida, se encuentra sobre un dispositivo, como

el que muestra la **Figura II.A.23**, constituido por una barra magnética que se encuentra en el interior de una cubierta de vidrio y, típicamente cubierta con polidimetilsiloxano (*polydimethylsiloxane, PDMS*), comercialmente es conocido como Twister®.

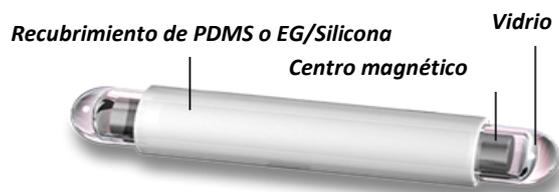


Figura II.A.23. Dispositivo SBSE.

El PDMS es un material polimérico apolar caracterizado por promover interacciones hidrofóbicas con las moléculas de interés, donde los mecanismos de retención ocurren principalmente a través de fuerzas de van der Waals, pero también se pueden formar enlaces o puentes de hidrógeno con átomos de oxígeno del PDMS dependiendo de la estructura del analito. A continuación, se comentarán algunas características específicas de este material [183]:

- La capacidad retentiva del PDMS para ciertos compuestos no está influenciada por la presencia de altas cantidades de agua u otros analitos, puesto que todos los solutos tienen su propio equilibrio de partición dentro de la fase de PDMS y el desplazamiento no tiene lugar.
- Los fragmentos de PDMS procedentes de la degradación contienen fragmentos de masa característicos los cuales pueden ser fácilmente descartados con el uso de un detector selectivo de masas.
- El PDMS tiene unas propiedades termoestables que permiten operar en un amplio rango de temperaturas y debido a ello, esta aproximación, que no necesita de disolventes; fue propuesta en principio para ser asociada a un cromatógrafo de gases con una unidad de desorción térmica (*thermal desorption, TD*).

La mayor limitación de la técnica SBSE es su polaridad, que está restringida hacia el análisis de analitos poco polares y la baja recuperación obtenida para los más polares ($\log k_{ow} < 3$) es debida a las interacciones hidrofóbicas débiles. Dada la

necesidad de superar esta restricción se han desarrollado nuevas fases. Bicchi y col. [186] desarrollaron un twister de fase dual empleando diferentes adsorbentes basados en el carbón como etapa adicional de concentración. La exitosa combinación de dos fases mejoró la recuperación de compuestos volátiles y polares en comparación con las barras agitadoras convencionales de PDMS. Liu y col. [187] describieron el uso de una fase porosa, compacta y estable térmicamente que presenta en su extremo terminal un grupo hidroxilo, adecuado para la extracción de PAHs, n-alcenos y pesticidas fosforados en matrices acuosas. Neng y col. [188] propusieron una espuma de poliuretano (*polyurethane, PU*) como nueva fase polimérica para la SBSE. Se demostró que estos polímeros presentan una estabilidad y resistencia mecánica excelente para el enriquecimiento de compuestos orgánicos en muestras acuosas.

3.1.2.1. Teoría de la SBSE

La extracción de los solutos desde la fase acuosa al medio de extracción está controlada por el coeficiente de partición de los solutos entre el PDMS y la fase acuosa. Este coeficiente de partición ha sido correlacionado con el coeficiente de distribución octanol/agua ($K_{o/w}$). Aunque no es del todo correcto, el $K_{o/w}$ nos da una buena idea de si un soluto dado puede ser extraído con SBSE y cómo [183].

El coeficiente de distribución entre el PDMS y la fase acuosa ($K_{PDMS/w}$) se encuentra definido como la proporción entre la concentración de soluto en el PDMS (C_{PDMS}) y la concentración de soluto en agua (C_w) en condiciones de equilibrio. Esta proporción es igual a la proporción de masa de soluto en el PDMS (m_{PDMS}) y la masa de soluto en la fase acuosa (m_w) multiplicado por la relación de fases (β , siendo $\beta = V_w/V_{PDMS}$) (Ecuación 1).

$$K_{o/w} \approx K_{PDMS/w} = \frac{C_{PDMS}}{C_w} = \frac{m_{PDMS}}{m_w} \times \frac{V_w}{V_{PDMS}} = \frac{m_{PDMS}}{m_w} \times \beta \quad \text{Ec. (1)}$$

La recuperación, expresada como el ratio de soluto extraída (m_{PDMS}) sobre la cantidad original de soluto en la fase acuosa ($m_o = m_w + m_{PDMS}$) es dependiente del coeficiente de distribución $K_{PDMS/w}$ y de β , tal y como se describe en la Ecuación 2.

$$R = \frac{m_{PDMS}}{m_o} = \frac{\frac{K_{PDMS/w}}{\beta}}{1 + \frac{K_{PDMS/w}}{\beta}} \quad \text{Ec. (2)}$$

La conclusión que se extrae de la Ecuación 2 es que sólo dos términos afectan a la recuperación del analito, $K_{PDMS/w}$ y β . A mayor cantidad de PDMS, mayor eficiencia de extracción [189].

3.1.2.2. Factores que afectan a la SBSE

La optimización de los factores que afectan al proceso de extracción conducirá a una mejor eficiencia en los procesos de la extracción, a la obtención de altas recuperaciones y factores de enriquecimiento mejorando los límites de detección. Estos factores incluyen: tipo, volumen y tamaño de la barra agitadora, tiempo de extracción, pH, adición de sal, velocidad de agitación, temperatura de extracción, volumen de muestra y adición de disolventes orgánicos.

El **volumen de recubrimiento de las barras agitadoras** afecta a la eficiencia de la técnica. A mayor volumen, mayor sensibilidad para los compuestos más polares con K_{ow} bajos.

El **tiempo de extracción** se controla siguiendo cinéticas de extracción, ya que se trata de una técnica de equilibrio, y viene determinada por otros aspectos como el volumen de muestra, la agitación, la temperatura y las dimensiones de la barra agitadora, que es aconsejable tener ya fijas y optimizadas.

El **pH** y la **fuerza iónica** de la matriz de la muestra son unos parámetros muy importantes. El pH en caso de ser necesario debe ser ajustado para que los analitos se encuentren en su forma no iónica, el rango de ajuste se sitúa entre 3 y 9 para evitar la degradación del recubrimiento de polímero [190-192]. La adición de sales inertes como el NaCl modifica la fuerza iónica de la matriz mejorando la extracción mediante la disminución de la solubilidad de los analitos polares [193,194], mientras que los poco polares sufren una reducción en la eficacia de extracción [195], como resultado de un incremento de la viscosidad de la muestra, de la absorción de la sal en el

recubrimiento de la barra magnética en vez del analito y de las interacciones iónicas de los analitos no polares y las sales inertes.

La **agitación** de la muestra aumenta la difusión de los analitos mediante la disminución del espesor de la capa límite existente entre los analitos de la matriz y el revestimiento de la barra agitadora. Este parámetro debe ser optimizado cuidadosamente porque altos valores de agitación (>750 rpm) pueden dar lugar a la formación de burbujas y causar estrías en el recubrimiento de polímero, siendo éstas generadas por el contacto y fricción contra el fondo del vial de la muestra [196].

La extracción a **temperatura** elevada aumenta la partición de los analitos entre el recubrimiento del twister y la matriz de la muestra, lo cual incrementa la eficiencia de extracción y disminuye el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio. Aunque existe el inconveniente de que al aumentar la temperatura disminuyen los coeficientes de distribución de absorción y la vida media del polímero del twister. Lo ideal es llegar a una situación de compromiso teniendo en cuenta la naturaleza de los analitos y la propia matriz de la muestra.

La adición de **disolventes orgánicos** a la muestra puede ayudar a minimizar la pérdida de analitos a causa de la adsorción de éstos en las paredes de los viales que los contiene [197], pero el volumen no debe superar el 5% del total del volumen de muestra porque dependiendo de la naturaleza de la matriz de la muestra, la afinidad de los analitos por el polímero de PDMS puede verse afectada.

El proceso analítico comprende básicamente dos pasos: la extracción o enriquecimiento de los analitos en la fase extractante y posteriormente la etapa de desorción de los compuestos desde el material adsorbente al sistema cromatográfico. Durante el proceso de extracción, las barras agitadoras se pueden colocar de forma que exista contacto directo con los solutos usando el modo de muestreo en inmersión o espacio de cabeza, como aparece esquematizado en la **Figura II.A.24**.

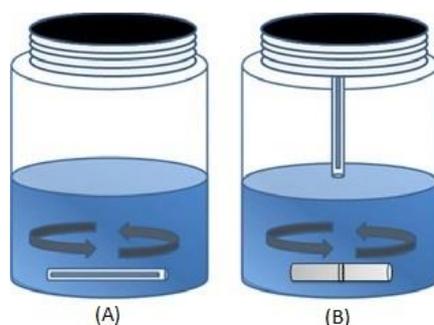


Figura II.A.24. Modos de extracción en SBSE: A) inmersión, B) espacio de cabeza.

Después de la etapa de extracción, las barras se retiran y se lavan con agua destilada con el objetivo de eliminar cualquier interferencia, como pueden ser sales, azúcares, proteínas u otras interferencias indeseables. A continuación, se secan con un papel para eliminar el agua y se procede con la etapa de desorción que puede ser térmica o líquida. La desorción térmica es la más directa y se encuentra limitada a compuestos volátiles o semi-volátiles siendo el análisis por cromatografía de gases la única opción viable para su determinación. La desorción térmica se considera una aproximación *on-line* puesto que hace posible la introducción de manera directa y completa de la muestra en el sistema cromatográfico, dando lugar a una buena sensibilidad y la posibilidad de la automatización. Por otro lado, la desorción líquida está más indicada para compuestos no volátiles y termolábiles. El tipo de disolvente, el tiempo en el que el polímero se encuentra sumergido en el disolvente y el número de etapas de desorción son variables importantes durante este proceso, en el cual es necesaria la inmersión completa de la barra agitadora en el disolvente dentro del vial, bajo tratamiento mecánico o mediante sonicación, para mejorar la eficiencia. La desorción líquida es una aproximación *off-line* que permite operar en combinación con cromatografía de gases, cromatografía líquida o con electroforesis capilar.

3.1.2.3. Extracción con polímeros Ad/absorbentes de bajo coste

Además de las fibras de SPME (Supelco) y los twister de la SBSE (Gerstel) de PDMS, estos materiales de bajo coste se encuentran disponibles en múltiples diseños (hoja o lámina, cuerda y tubos; **Figura II.A.25**) siendo en términos de extracción analítica parecidos a la SBSE y a la SPME, pero con las ventajas de que son más baratos, flexibles y robustos. Además, existe la posibilidad de seleccionar el volumen

de polímero según las necesidades aunque lo habitual para el caso de los tubos es cortar piezas de 1 cm de longitud y en el caso de láminas una superficie de 0.25 cm² para facilitar la desorción en pequeños volúmenes de disolvente.



Figura II.A.25. Formatos comerciales de PDMS: a) cuerda, b) tubo y c) lámina

3.1.2.4. Aplicación de la SBSE a la extracción de PAHs en matrices acuosas

La LLE es considerada como un clásico en la preparación de muestra para el análisis de PAHs en matrices acuosas y además está estipulada en el estándar respectivo (DIN EN ISO 17993 2004-03). Sin embargo, este método tiene varias desventajas como la necesidad de grandes cantidades de muestra, uso de disolventes orgánicos y posibles pérdidas de analito debidas a la adsorción en la superficie del material [198].

Métodos de extracción alternativos basados en el equilibrio como la microextracción en fase sólida (SPME) o la extracción con barras agitadoras (SBSE) han sido desarrollados y bien establecidos para el análisis de PAHs. Estos métodos son normalmente más rápidos que la LLE, requieren menos cantidad de muestra y proporcionan mejores límites de cuantificación (*limits of quantification, LOQs*) [199].

Existen estudios en los que se han testado métodos de SPME y SBSE en matrices acuosas con alto grado de complejidad frente a la LLE y la SBSE ha mostrado ser un método lo suficientemente bueno para poder analizar este tipo de muestras. Hay que señalar que el principal inconveniente cuando se trabaja con matrices que presentan gran cantidad de material particulado, coloides y materia orgánica disuelta (*dissolved organic matter, DOM*), tanto la SPME como la SBSE normalmente sólo detectan la fracción de PAHs que se encuentra disuelta en la fase acuosa, pero no los compuestos

adsorbidos a la DOM o los que se encuentran unidos a los coloides. No obstante, los PAHs unidos a coloides pueden ser accesibles hacia la SBSE, puesto que las barras agitadoras contienen mayor cantidad de material adsorbente que las fibras de SPME. Krüger y col. [198] desarrollaron un método de SBSE simple propuesto como método alternativo a la LLE que ofrece recuperaciones muy razonables comprendidas entre el 82 y el 104 %. En el 2015, Krüger y col. [199] compararon la SBSE y la SPME. Los resultados corroboraron que la SBSE está menos afectada por matrices complejas obteniendo una mejor reproducibilidad de los experimentos que para la SPME.

Habitualmente, la determinación de PAHs en muestras acuosas suele llevarse a cabo con equipos de cromatografía líquida de alta resolución acoplados con un detector de fluorescencia (HPLC-FL). Para el proceso de extracción mediante SBSE, el material empleado, ya sea en formato twister recubiertos de PDMS, tubos o cuerdas, es necesario someterlo a un tratamiento de acondicionamiento (en muchos casos con disolventes tipo acetonitrilo o metanol). Para la desorción, algunos de los métodos que se van a describir en este apartado de la Tesis implican una etapa *off-line* con disolventes en pequeños volúmenes (microlitros, μL) (**Tabla II.A.14**) y otros directamente serán extraídos mediante desorción térmica en el caso de emplear un cromatógrafo de gases como se muestra en la **Tabla II.A.15**.

Tabla II.A.14. Resumen de los métodos recogidos en la bibliografía que analizan PAHs en muestras líquidas mediante SBSE y HPLC-FLD.

Análitos	Volumen muestra (mL)	Volumen y tipo de dispositivo	Condiciones de extracción	Desorción	Determinación	LOD (ng L ⁻¹)	Ref
NAFT, ACY, ACE, FLU, FEN, ANT, FLUOR, B[a]A, PIR, CRIS, B[b]F, B[a]P, DB[a,h]A, B[g,h,i]P, I[1,23-c-d]P	10	Tubos PDMS (8µL)	3 horas (300 r.p.m) T _a ambiente	10 min en baño de ultrasonidos (ACN)	HPLC-FLD	0.1-1.2	[200]
B[b]F, B[k]F, B[a]P, B[g,h,i]P, I[1,2,3-c,d]P, FLUOR, B[a]A, DB[a,h]A	40	Twister (24 µL)	40 min (- r.p.m) T _a =60°C	5 min sin baño de ultrasonidos (ACN)	HPLC-FLD	0.5-7.3	[201]
NAFT, ACE, FEN, ANT, FLUOR, PIR	(a)CF-SBSE (10L)(lab) (b)DI-SBSE (500) (lab) (c)HS-SBSE (500) (in situ)	Agitador eléctrico casero de PDMS ^a (20 mm x 1mm)	(a) 30 min (4000 r.p.m) (b) 50min (3000 r.p.m) (c) 30 min (4000 r.p.m)	- min en baño de ultrasonidos (MeOH)	HPLC-FLD	(a) 0.09-3.75 (b) 0.05-3.41 (c) 0.03-2.23	[202]
NAFT, ACY, ACE, FLU, FEN, ANT, FLUOR, B[a]A, PIR, CRIS, B[b]F, B[a]P, DB[a,h]A, B[g,h,i]P, I[1,23-c-d]P	10	Barra agitadora con recubrimiento de PDMS/Al-MIL-53-NH ₂ ^{a,b}	20 min (700 r.p.m)	10 min en baño de ultrasonidos	HPLC-FLD	0.05-2.94	[203]

^a Recubrimiento y preparación de las barras agitadoras mediante el proceso sol-gel^b PDMS/Al-MIL-53-NH₂: 125 mg de OH-PDMS, 100 µL de MTMS, 250 µL de CH₂Cl₂, 30 µL de PMHS, 50 mg de Al-MIL-53-NH₂ y 100 µL de 95% de TFA

Tabla II.A.15. Comparación de los límites de detección obtenidos mediante diferentes aproximaciones para la determinación de PAHs en agua.

Método	LODs para PAHs (ng L ⁻¹)						Matriz de la muestra	Ref
	NAFT	ACE	FEN	ANT	FLU	PIR		
PDSM-SBSE-TD-CG-MS	0.32	0.17	0.23	0.43	1.15	0.95	Agua de mar	[204]
PDSM-SBSE-TD-CG-MS	0.5	1.5	0.8	1.2	0.1	0.7	Muestras acuosas	[205]
PDSM-SBSE-TD-CG-MS	31.9	3.07	7.01	1.73	4.79	4.33	Solución fortificada con 30% MeOH	[206]
PDMS-SBSE-HPLC-FLD	0.1	3.7	8.9	1.3	0.1	0.5	Té (mate)	[207]
PDSM-SBSE-HPLC-FD	0.2	1.3	0.4	0.2	1.5	0.7	Agua de lluvia	[208]
Portable PDMS-SBSE-HPLC-FD	0.36 ^a	0.15 ^a	0.05 ^a	0.17 ^a	3.41 ^a	0.19 ^a	Agua Milli-Q	[202]
	0.10 ^b	0.06 ^b	0.06 ^b	0.03 ^b	2.23 ^b	0.06 ^b		
	0.26 ^c	0.22 ^c	0.09 ^c	0.27 ^c	3.75 ^c	0.27 ^c		

^a SBSE^b HSSE^c CF-SBS

3.2. Muestras sólidas

La preparación de muestra es un paso crucial en el proceso analítico. El análisis de los compuestos de interés es a menudo un proceso complejo, en el que las interacciones entre el analito y la matriz son más significativas. En este sentido cabe señalar la presencia de compuestos interferentes que pueden dar lugar a una supresión o aumento de la señal cromatográfica (denominado efecto de matriz) afectando a la sensibilidad del método.

La *extracción Soxhlet* fue introducida a mitad del siglo XIX y desde entonces siempre se ha considerado como método de referencia para asegurar la eficiencia de extracción de cualquier nueva metodología. Para la extracción, la muestra debe estar totalmente pulverizada y ésta se introduce en un cartucho de material poroso que va habilitado en la cámara de extractor Soxhlet. En el matraz se calienta el disolvente, con el que se extraerán los analitos solubles y, cuando se condensan los vapores, éstos caen sobre el cartucho que contiene la muestra. Cuando el nivel del disolvente condensado en la cámara alcanza la parte superior del sifón lateral, el disolvente, con los analitos disueltos asciende por el sifón, y retorna al matraz de ebullición. Este proceso se repite hasta que se completa la extracción de los analitos de la muestra y se concentran en el disolvente. Esta técnica permite obtener recuperaciones cuantitativas.

Otra técnica convencional para la extracción de contaminantes es la *extracción asistida por ultrasonidos (ultrasound-assisted solvent extraction, USE)*. La radiación de ultrasonidos, cuando es transmitida a través de un medio, genera una perturbación que, si se repite periódicamente, crea ciclos de expansión y compresión [209]. Cuando la intensidad de los ultrasonidos es lo suficientemente alta durante el ciclo de expansión se crean burbujas o cavidades. La cavitación es el proceso por el que las burbujas se forman y luego se someten a colapso implosivo. El efecto mecánico de los ultrasonidos induce una mayor penetración del disolvente en matrices sólidas y la erosión mecánica de sólidos, incluyendo la rotura de las partículas, lo que mejora la transferencia de masa, conduciendo a una mayor eficiencia de la extracción. La sonicación proporciona un contacto eficiente entre el sólido y el agente de extracción,

que por lo general resulta en una buena recuperación del analito. El proceso se lleva a cabo más comúnmente usando un baño de ultrasonidos, o empleando una sonda ultrasónica [210].

Técnicas instrumentales de extracción

Las matrices sólidas o semi-sólidas son a menudo más complicadas y exigentes. Normalmente, deben encontrarse en una forma líquida para poder ser introducidas en los equipos de medida, a menos que sólo la parte volátil de la muestra sea la de interés ya que en este caso se emplean técnicas de desorción térmica que ayudan a aislar o concentrar el analito. En la mayoría de los casos, la matriz de la muestra puede ser insoluble en disolventes comunes. Hay muchos casos en que los analitos no se transfieren fácilmente a partir de una matriz insoluble debido a la inclusión o la adsorción. La transferencia de masa de los solutos al seno de una fase líquida, empleando normalmente disolventes como el metanol o etanol, es bastante lenta siendo éste el paso determinante durante el procedimiento de preparación de la muestra. Nuevos enfoques y dispositivos para mejorar la transferencia de masa durante la extracción han proporcionado mejores rendimientos, gran automatización y mejor reproducibilidad. Las técnicas a las que se hacen referencia son la *extracción con líquidos presurizados (Pressurized Liquid Extraction, PLE)*, la *extracción asistida por microondas (Microwave-assisted Extraction, MAE)* y la *extracción con fluidos supercríticos (Supercritical Fluid Extraction, SFE)* [211].

La *extracción con líquidos presurizados (PLE)* conocida también como extracción con fluidos presurizados (PFE) es una técnica de preparación de muestras que combina temperatura y presión elevadas con disolventes líquidos para lograr la extracción rápida y eficiente de los analitos a partir de la matriz sólida debido fundamentalmente a los efectos en la solubilidad, la transferencia de masa y la ruptura del equilibrio superficial. PLE tiene varias ventajas sobre otras técnicas de extracción (como por ejemplo Soxhlet o microondas), tales como una mayor eficacia de la extracción, mejor reproducibilidad, reducción del consumo de disolvente y de manipulación de la muestra y mayor rendimiento de la muestra debido a su alto grado de automatización [212].

En la *extracción asistida por microondas* (MAE) la energía de microondas se utiliza para calentar disolventes en contacto con muestras sólidas o líquidas promoviendo la partición de los analitos de la matriz de la muestra al disolvente de extracción. La energía de microondas es una radiación no ionizante (frecuencia 0.3-300 GHz) que causa el movimiento molecular por la migración de los iones y la rotación de los dipolos. Por lo tanto, el principio de MAE se basa en el efecto directo de las microondas sobre las moléculas del sistema de extracción causadas por dos mecanismos, la conducción iónica y la rotación dipolar. La conducción iónica genera calor debido a la resistencia del medio al flujo de iones. La rotación dipolo se refiere al movimiento alternativo de las moléculas polares que intentan alinearse con el campo magnético. Las múltiples colisiones de las moléculas generan liberación de energía y por tanto un incremento de la temperatura del disolvente favoreciendo la migración de los analitos de la muestra [213].

La *extracción con fluidos supercríticos* (SFE) es una técnica que utiliza un disolvente en su estado supercrítico. Los fluidos supercríticos presentan propiedades intermedias entre un gas y un líquido lo que favorece su penetración en diferentes matrices y, por lo tanto la solubilización de los solutos. Además, la densidad puede ajustarse variando la presión y la temperatura, de modo que pueden realizarse extracciones altamente selectivas [214].

3.2.1. Dispersión de matriz en fase sólida

La técnica de la dispersión de matriz en fase sólida (*matrix solid-phase dispersion, MSPD*) fue introducida por vez primera en 1989 por Barker y col. [215] para llevar a cabo la extracción de residuos procedentes de la ingestión de fármacos en tejido bovino. Desde entonces, la MSPD ha sido considerada como una técnica eficiente y versátil para la separación de un amplio abanico de sustancias, como pesticidas, fármacos o compuestos de origen natural, a partir de una amplia variedad de muestras de origen animal y vegetal.

La MSPD se podría definir como un proceso de extracción sólido-sólido en el cual una de las fases es la matriz sólida (o semi-sólida) investigada y la otra es la

designada como adsorbente. Aunque en la práctica este procedimiento fue desarrollado para muestras sólidas, su aplicación se extendió muy pronto a muestras viscosas y líquidas.

El éxito creciente de la MSPD se debe sobre todo a su simplicidad (no requiere instrumentación o equipamiento específico), flexibilidad y robustez comparado con otros métodos de preparación de muestra. Las condiciones de extracción son suaves (temperatura ambiente y presión atmosférica) lo que permite la preservación de los analitos de la degradación o de la desnaturalización. No obstante, se puede combinar conjuntamente con PLE para incrementar las recuperaciones de los compuestos que interaccionan fuertemente con la matriz.

Una importante desventaja frente a otras técnicas es la imposibilidad de automatización, representando esto un gran obstáculo en análisis de rutina.

3.2.1.1. Etapas de la MSPD

El procedimiento básico de esta técnica consiste esencialmente en tres pasos, como se puede observar en la **Figura II.A.26**:

- 1) El primer paso consiste en colocar la muestra (sólida, semi-sólida, viscosa o líquida) en un mortero de vidrio o ágata en el que se halla el material dispersante para moler conjuntamente todo con la ayuda de una mano de mortero con el objetivo de conseguir la disrupción de la estructura de la muestra y lograr de esta manera una distribución homogénea por todas las partículas del soporte sólido. Un parámetro crítico es la relación muestra/adsorbente (generalmente 1:1-1:4) el cual depende del tipo de muestra y las características físico-químicas del material adsorbente.
- 2) La mezcla pulverizada es transferida y empaquetada en una columna o cartucho de SPE, normalmente de polipropileno. Los mecanismos de retención, basados en un conjunto de equilibrios de partición y/o adsorción (similares a los que ocurre en una columna cromatográfica), son los responsables de la distribución de los analitos entre la muestra dispersada y el disolvente de elución.

- 3) Finalmente, el último paso consiste en la elución de los analitos de interés con el disolvente o mezcla de disolventes apropiados.

Dependiendo de la naturaleza del material adsorbente seleccionado, se puede realizar un paso previo de limpieza mediante la retención irreversible en la columna de componentes específicos de la matriz. Se conoce como limpieza *on-line* y la purificación de la muestra se consigue introduciendo una capa de co-adsorbente al final del cartucho de MSPD. Otra alternativa que incrementa la selectividad de la extracción es llevar a cabo un lavado previo en el protocolo antes de la elución de los analitos.

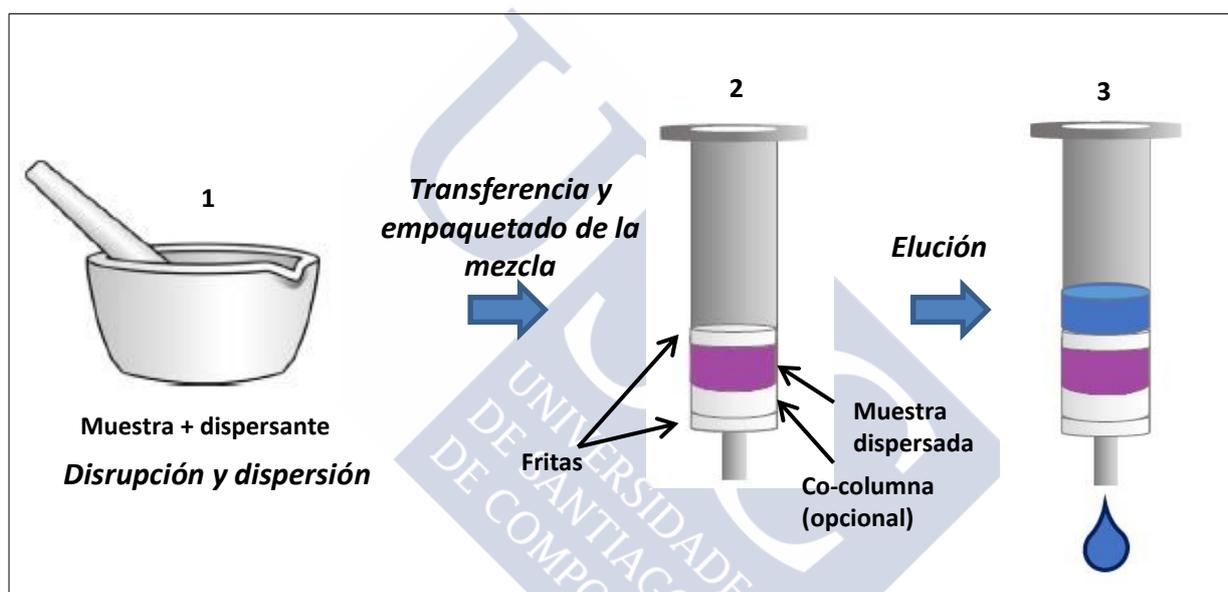


Figura II.A.26. Representación esquemática de las etapas del proceso de MSPD.

3.2.1.2. Parámetros que influyen en el proceso de extracción mediante MSPD

Las aplicaciones clásicas de esta técnica emplean adsorbentes de fase reversa como dispersantes, siendo el octadecil-sílica (C_{18}) el más empleado aunque también se han considerado fases de C_8 y C_{30} [216-218]. El empleo de este tipo de materiales ha sido destinado a la retención selectiva de compuestos con polaridad media o poco polares. En los últimos años, se ha observado que el reemplazo de C_{18} por amino-propil sílica (*amino-propyl silica* o *primary and secondary amine, PSA*) ofrece buenos resultados puesto que su carácter intercambiador aniónico conduce a una buena selectividad debido a la retención de ácidos grasos presentes en gran número de muestras de alta complejidad. Otro tipo de adsorbentes con fases no enlazadas son los

de fase normal y entre ellos los ejemplos más característicos son la sílice, la alúmina y el florisil. Este tipo de fase solamente interacciona con la muestra mediante adsorción siendo imposible la descomposición de la matriz de la muestra. Las propiedades de adsorción de estos materiales dependen de su contenido en agua o de su carácter ácido o básico. Finalmente, existen los soportes sólidos inertes, como son la celita, la tierra de diatomeas o la arena. Éstos tienen un único papel abrasivo para asegurar la completa disrupción de la muestra. Más recientemente, nuevos materiales adsorbentes se van abriendo camino entre las aplicaciones de la MSPD, entre ellos nos encontramos con los polímeros de impronta molecular (*molecularly imprinted polymers, MIPs*) y materiales basados en el carbono.

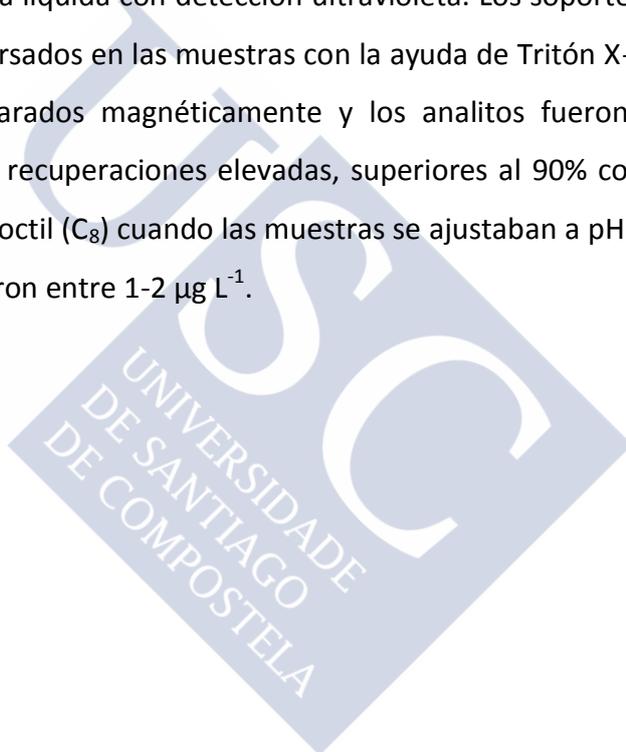
La selección del disolvente(s) de elución es muy importante ya que el objetivo es la elución de los analitos de interés aunque a veces se puede utilizar un paso previo de lavado dirigido específicamente a la eliminación de sustancias interferentes. Las columnas de MSPD permiten la separación y el aislamiento de analitos con diferentes polaridades o incluso una familia entera de compuestos en un único disolvente o en diferentes disolventes cambiando la polaridad, lo que permite una separación multi-residuo. Sustancias poco polares se pueden recuperar con disolventes apolares, como hexano o diclorometano, o incluso una mezcla de ambos. Si por el contrario nos encontramos con compuestos de polaridad media o alta, el acetonitrilo, la acetona o el acetato de etilo son buenas alternativas.

En cuanto a la matriz de la muestra, ésta puede necesitar de un paso extra en el que se trata de cambiar su estado de ionización de manera que permita las interacciones necesarias entre la fase enlazada del soporte y/o el disolvente de elución. Una forma de lograr este propósito es mediante la adición de agentes quelantes, ácidos, bases, etc.

3.2.1.3. Aplicaciones de la MSPD para la determinación de COXIBs

En los últimos años la MSPD ha sido empleada para la determinación de una gran variedad de compuestos químicos en diversas matrices, tanto alimentarias [219-221] como biológicas [222,223] o medioambientales [224-227].

Hasta la fecha no existen aplicaciones directamente relacionadas con la extracción de COXIBs empleando la metodología de la MSPD. La única evidencia de un posible inicio en este campo es el trabajo realizado por Aguilar-Arteaga y col. [228] en el que se ha puesto a punto un método de rutina para el análisis de cuatro NSAIDs (acetaminofen, naproxeno, diclofenaco e ibuprofeno) en muestras de agua residual. La idea de poder llevar a cabo la extracción de los cuatro NSAIDs fue concebida bajo la premisa de lograr la síntesis de unos soportes magnéticos funcionalizados con diferentes adsorbentes, como los empleados en la MSPD, recubiertos de magnetita. La metodología general implica la dispersión magnética de la matriz seguido del análisis mediante la cromatografía líquida con detección ultravioleta. Los soportes magnéticos fueron inicialmente dispersados en las muestras con la ayuda de Tritón X-100, después los soportes fueron separados magnéticamente y los analitos fueron eluidos con metanol. Se encontraron recuperaciones elevadas, superiores al 90% con un soporte que contenía cadenas de octil (C_8) cuando las muestras se ajustaban a pH 3. Los límites de detección se encontraron entre $1-2 \mu\text{g L}^{-1}$.







II.B. TÉCNICAS DE DETERMINACIÓN

4. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN

La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) ha propuesto la siguiente definición para la cromatografía: *la cromatografía es un método físico de separación, en el que los componentes a separar se distribuyen en dos fases, una estacionaria (fase estacionaria) y otra que se mueve (fase móvil) en una dirección definida* [229]. La separación se produce en función de las diferencias en los coeficientes de distribución de los distintos componentes de la muestra entre las dos fases. Las técnicas cromatográficas han sido más valiosas que cualquier otra en lo referente a la separación y en el análisis de mezclas muy complejas, habiendo revolucionado las posibilidades de la química analítica.

Los dos tipos principales de cromatografía son la cromatografía de gases y la cromatografía de líquidos. Ambas técnicas son ampliamente empleadas para la separación de PAHs [230] así como de los COXIBs, acopladas a diferentes sistemas de detección.

4.1. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA

Las razones fundamentales de la popularidad alcanzada por esta técnica son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas, su idoneidad para la separación de especies polares, no volátiles o termolábiles, y sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria y en muchos campos de la ciencia, como por ejemplo aminoácidos, proteínas, hidrocarburos, drogas, plaguicidas, antibióticos esteroideos y no esteroideos, etc.

4.1.1. Sistemas de detección

4.1.1.2. Detectores de absorbanza Ultravioleta-Visible

La absorción de radiación ultravioleta y visible por parte de las moléculas ocurre en una o más bandas de absorción electrónicas, cada una de las cuales se compone de muchas líneas juntas, pero discretas. Cada línea surge de la transición de un electrón del estado fundamental al excitado.

La absorción de radiación por moléculas orgánicas en la región del espectro con longitudes de onda comprendidas entre 180 y 780 nm resulta de la interacción de

fotones y electrones que participan de manera directa en la formación de enlaces o que se localizan en torno a átomos como los de oxígeno, azufre, nitrógeno y halógenos.

La longitud de onda a la que absorbe una molécula orgánica depende de la fortaleza de los enlaces de sus electrones. Los electrones compartidos en los enlaces simples carbono-carbono o carbono-hidrógeno están sujetos con tal firmeza que su excitación requiere energías que corresponden a la longitud de onda de la región ultravioleta al vacío inferior a 180 nm. No se utilizan este tipo de espectros de enlace simple para aplicaciones analíticas debido a las dificultades experimentales que presentan. Los electrones de enlaces dobles y triples de moléculas orgánicas se sujetan con menos fuerza excitándose mediante radiación con más facilidad, así pues las especies con enlaces no saturados exhiben picos de absorción útiles.

Esta técnica espectrofotométrica se puede aplicar a compuestos orgánicos que presentan grupos cromóforos (grupos orgánicos funcionales no saturados que absorben en las regiones ultravioleta o visible), aunque también se aplica a algunas especies inorgánicas que también absorben, puesto que algunos iones de metales de transición adquieren color en disolución siendo posible determinarlos mediante esta técnica [231]. En el pasado la determinación de PAHs mediante cromatografía líquida (HPLC) se llevaba a cabo empleando detectores UV [232]. Sin embargo, es bastante conocido que esta técnica presenta problemas de selectividad y limitaciones en la sensibilidad, no siendo capaz de discriminar interferencias de matriz, sobre todo en aquellas que muestran gran complejidad. Por el contrario, el detector de fluorescencia (FL) es mucho más selectivo y sensible que el de UV.

4.1.1.3. Detectores de espectrometría de fluorescencia molecular

La fluorescencia es un proceso de fotoluminiscencia en que átomos y moléculas se excitan con la absorción de la radiación electromagnética. La fluorescencia molecular se cuantifica al excitar la muestra a la longitud de onda de absorción, también conocida como longitud de onda de excitación, y medir a una longitud de onda mayor, denominada longitud de onda de emisión o fluorescencia. Generalmente la emisión de fluorescencia se mide en ángulo recto al haz incidente, para no medir la

radiación incidente. La emisión que tiene un tiempo de vida más corto se conoce como *fluorescencia*, mientras que la luminiscencia que permanece por más tiempo se denomina *fosforescencia*.

La característica más atractiva es su sensibilidad inherente, habitualmente de uno a tres órdenes de magnitud mayor que con la espectroscopía de absorción. Otra ventaja de los métodos de fluorescencia es su amplio intervalo de concentración lineal, aunque cabe destacar que dichos métodos tienen menos aplicaciones que los de absorción dado el limitado número de sistemas químicos que presentan fluorescencia apreciable. Así pues, la cromatografía líquida acoplada a FL fue ampliamente extendida para la determinación de PAHs en diferentes matrices aprovechando sus propiedades fluorescentes, incluyendo comestibles y bebidas, debido a su simplicidad con respecto a otros sistemas de detección [233]. Algunas de las características de FL que presentan los PAHs son [234]:

- I. La mayoría de los hidrocarburos aromáticos sustituidos exhiben fluorescencia en la región ultravioleta o visible.
- II. Los espectros de absorción y fluorescencia de estos compuestos tienden a desplazarse a longitudes de onda mayores a medida que el número de anillos aromáticos aumenta.
- III. Para cierto número de anillos aromáticos fusionados es común observar que sistemas con anillos lineales presentan fluorescencia a longitudes de onda mayores que los sistemas no lineales. Por ejemplo, el hidrocarburo aromático lineal de tres anillos, Antraceno, exhibe su pico de fluorescencia más intenso a 400 nm, mientras que el Fenantreno exhibe su máximo de emisión sobre los 365 nm. Estas diferencias en la absorción y en la fluorescencia máxima, nos da la oportunidad de diferenciar los PAHs presentes en mezcla, aunque las posibilidades se encuentren restringidas por el ancho de los espectros individuales.
- IV. El espectro de fluorescencia de los PAHs es algo menos complicado que el de absorción y la posibilidad de solapamientos espectrales en mezclas es mayor en el fenómeno de absorción que en el de fluorescencia.

- V. En común con otras moléculas orgánicas, los PAHs no presentan fosforescencia en disolución.

4.1.1.4. Detectores de espectrometría de masas

En la presente Tesis Doctoral se ha utilizado la cromatografía líquida en combinación con la espectrometría de masas en tándem. En concreto se ha utilizado un sistema híbrido de tipo cuadrupolo tiempo de vuelo (Q-TOF) para el análisis de COXIBs en muestras de agua y lodos.

Los espectrómetros de masas constan de 3 partes esenciales: una fuente de ionización, un analizador de masas selectivo y un detector de iones. La muestra está sometida a una sucesión de pasos:

- 1) **Ionización:** la muestra en fase gas o vapor se ioniza en la fuente. En esta etapa el espectrómetro de masas genera iones en fase gas mediante algunos de los procedimientos que posteriormente se describirán.
- 2) **Aceleración:** una vez que los iones se forman, éstos son inmediatamente centrados y acelerados por una serie de lentes electrónicas, para aumentar su energía cinética.
- 3) **Separación:** los iones son 'filtrados' por el analizador de acuerdo a su proporción *masa/carga* (m/z).
- 4) **Detección:** después de la separación, los iones terminan su camino cuando alcanzan el sensor de detección, el cual mide la carga eléctrica y amplifica la corriente iónica.
- 5) **Visualización del espectro de masas** resultante del tratamiento de la señal enviado por el detector.

4.1.1.4.1. Parámetros de calidad

- **Resolución:** este término es siempre relevante en la separación de iones con valores de m/z diferentes. En espectrómetros que separan iones empleando campos cuadrupolares (trampa de iones cuadrupolar y cuadrupolos de transmisión) la resolución es constante a lo largo de la escala m/z .

- Poder de resolución: por definición se describe como la habilidad que posee el espectrómetro de masas para distinguir entre dos iones vecinos que difieren sólo ligeramente en sus masas. Empíricamente se expresa como la relación $M/\Delta M$ donde M es la masa del pico y ΔM es la diferencia entre los picos del espectro de masas.
- Exactitud de masas: la exactitud de masas compara la m/z medida por el instrumento con la m/z teórica correspondiente a un determinado ion. La medida de los valores de m/z de estos iones se presenta en partes por millón (ppm). La definición de ppm en espectrometría de masas se puede describir como:

$$\text{ppm} = [(E-A)/E] \times 10^6$$

donde **E** es la masa exacta calculada de un determinado pico y **A** la masa exacta medida para dicho ion. A veces también se expresa en MDa (**E-A**).

- Límite superior de masa: todos los espectrómetros pueden determinar la proporción m/z hasta un valor máximo. El mayor valor de masa, en Daltons, dependerá del número de cargas z que el ión soporta, por ejemplo, si el espectrómetro es capaz de medir m/z hasta 2000, sería posible detectar un ion de masa 80 kDa soportando 40 cargas elementales ($q = 40e$).
- Sensibilidad: se define como la variación de la corriente iónica que genera un cambio en la cantidad de analito en la fuente de ionización. Viene dada por el peso de la muestra consumida por segundo (por ejemplo, pg/s o femtomoles/s) para obtener una señal de intensidad normalizada. Puesto que el haz de iones persiste solamente en un período corto de tiempo, existe una renovación permanente y dinámica de iones: los espectros son obtenidos mediante el escaneo repetitivo.

4.1.1.4.2. Métodos de ionización para HPLC para el acoplamiento a espectrometría de masas

La ionización del analito es el primer paso crucial para el análisis de cualquier clase de compuestos por espectrometría de masas. La clave del éxito recae en gran

medida en la conversión de unos compuestos neutros en especies iónicas en fase gaseosa [235].

En cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (Liquid Chromatography coupled Mass Spectrometry, LC/MS) una de las etapas más críticas consiste en eliminar el disolvente del eluato cromatográfico manteniendo un nivel de vacío adecuado en el espectrómetro de masas para generar los iones en fase gas. Para evitar este problema se desarrollaron una serie de interfases, siendo las técnicas de ionización a presión atmosférica (API), en las que dicha interfase funciona como fuente de ionización, las que han logrado solventar dichos problemas. Entre ellas cabe resaltar las siguientes:

- Ionización por electrospray o electronebulización (ESI)
- Ionización química a presión atmosférica (APCI)
- Foto-ionización a presión atmosférica (APPI)

En esta Tesis doctoral se ha empleado la ionización por electrospray (*electrospray ionization, ESI*) en todos los análisis realizados mediante LC/MS. ESI es una técnica aplicable a un gran rango de compuestos en fase líquida. Ha tenido gran impacto en la caracterización de biomoléculas de elevado peso molecular, llegando a ser la interfase más satisfactoria para las aplicaciones LC/MS y electroforesis capilar acoplada a espectrometría de masas (Capilar Electrophoresis coupled Mass Spectrometry, CE/MS) [236,237]. Se trata de un proceso que produce un fino spray de gotas altamente cargadas bajo la influencia de un campo eléctrico intenso. La evaporación del disolvente convierte esas gotas cargadas en iones en fase gas. La muestra, en el disolvente adecuado, fluye continuamente por un tubo capilar de acero inoxidable cuyo extremo está sometido a un alto potencial con respecto a la región de las paredes circundantes que se encuentran a presión atmosférica, llamada contraelectrodo. La diferencia de potencial entre el extremo del tubo y capilar y el contraelectrodo produce un campo electrostático suficientemente fuerte para dispersar la disolución emergente en una fina niebla de gotas cargadas. La evaporación de dichas gotas es asistida por una corriente de gas de nitrógeno. Durante el proceso de evaporación de las gotas, algunos de los iones disueltos son transferidos a la fase gas. Los iones resultantes son

transportados desde la región de presión atmosférica a la de alto vacío del analizador de masas.

Los iones formados en la etapa de ionización son separados en el analizador de acuerdo a sus valores de masa/carga (m/z) basado en sus comportamientos frente a la aplicación de campos eléctricos y/o magnéticos. Para su uso en sistemas cromatográficos, los analizadores deben de medir un amplio rango de masas en un tiempo muy corto, por lo que muchas medidas (al menos 10) se pueden hacer en cada pico cromatográfico. Lo ideal es que el analizador sea capaz de distinguir entre diferencias muy pequeñas de masa y permitir el paso del número de iones suficientes para producir corrientes iónicas fáciles de medir.

4.1.1.4.3. Tipos de analizadores

El **analizador cuadrupolar** (Figura II.B.27) es probablemente el más utilizado. Un cuadrupolo consiste en cuatro barras de metal (electrodos) paralelas. La separación de masas se produce en función del movimiento vibratorio estable de iones oscilando a alta frecuencia en un campo eléctrico creado por potenciales de corriente continua (DC) y radio frecuencia (RF) en estos electrodos [238,239]. Bajo un conjunto de potenciales definidos de DC y RF, los iones con un valor concreto de m/z atraviesan la geometría de barras cuadrupolares. El espectro de masas se obtiene cambiando ambos potenciales DC y RF mientras su relación se mantiene constante.

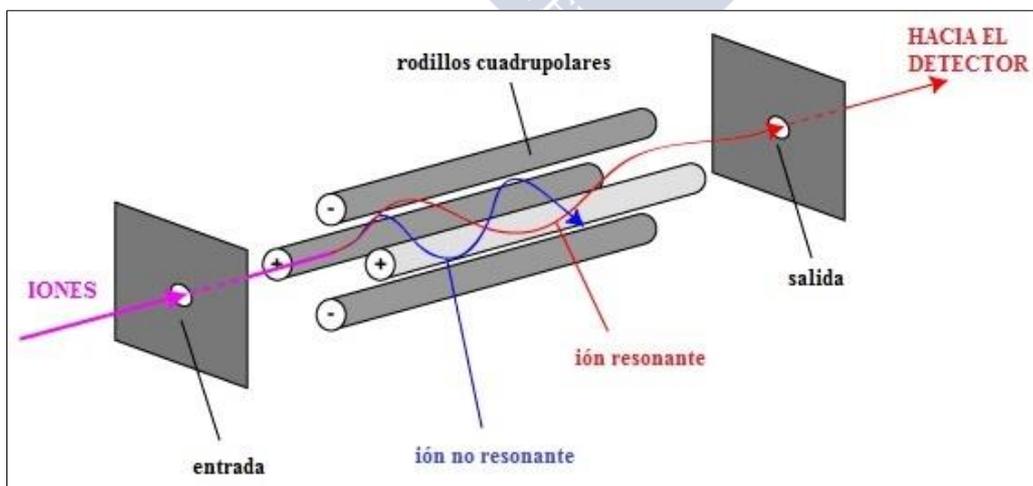


Figura II.B.27. Esquema representativo de un analizador cuadrupolar simple.

Los cuadrupolos tienen distintos modos de transición de iones:

- Modo SIM: los potenciales de RF y DC se mantienen constantes y sólo los iones con un valor específico de m/z pueden atravesar el analizador, el resto de iones chocan con los rodillos y no llegan al detector.
- Modo SCAN: los potenciales se varían linealmente manteniendo constante la relación RF/DC. El resultado es la filtración continua de los iones con m/z crecientes, dando lugar al espectro de masas de la molécula de partida.

Este tipo de analizadores ha sido usado tanto en análisis de fármacos como en todo tipo de contaminantes medioambientales. Su aplicación permite la determinación de un gran número de compuestos [240].

Otro analizador popular por su simplicidad es el **analizador de tiempo de vuelo (TOF)** (Figura II.B.28). El principio básico de separación de iones fue conceptualizado por Stephens en 1946 [241]. Este analizador de masas consiste en un tubo de vuelo libre de campo en el que los iones son separados en base a sus diferentes velocidades. Un corto pulso de iones, de energía cinética definida, se dispersa con el tiempo cuando viaja a través de un tubo de vuelo. Además los iones con menor relación m/z viajan más rápido y llegan antes al detector que los de mayor m/z .

Algunas de las características más destacables son que poseen un rango de masas ilimitado, sin embargo se pone cierta restricción al límite superior de dicho rango a causa de la dificultad en la detección de iones con valores muy elevados de m/z y el ancho de los picos influenciados por la distribución isotópica; alta eficacia de transmisión de iones, capacidad de detección multiplex, simplicidad en la operación y en el diseño del instrumento y su bajo coste.

La resolución está relacionada con la anchura de la señal del conjunto de iones con la misma masa cuando éstos llegan al detector. En la fuente de iones, éstos se aceleran desde la región de origen debido a la dispersión inherente en el tiempo (formación de los iones instantánea), el espacio (localización de los iones en el momento de aceleración) y la velocidad (debido a la diferencia de energía cinética inicial en los iones). Estos son los tres factores que limitan la resolución en un

instrumento de tiempo de vuelo. Para mejorar la resolución y la exactitud de masas, los TOF modernos incorporan aceleración ortogonal o sistema de reflectrón [235].

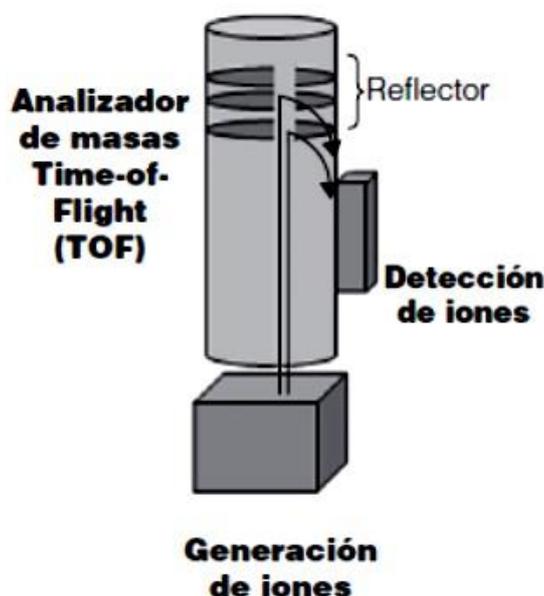


Figura II.B.28. Analizador de tiempo de vuelo con sistema de reflectrón.

4.1.1.4.3. Espectrometría de masas en tándem

La espectrometría de masas en tándem (Tandem Mass Spectrometry, MS/MS) se refiere al acoplamiento de dos etapas de análisis de masas, ya sea en el tiempo o en el espacio, para obtener información adicional respecto a LC/MS. Los experimentos en MS/MS se pueden realizar en espectrómetros de masas provistos con más de un analizador (usualmente con tres, siendo el intermedio aquel que actúa como celda de colisión). Uno de los espectrómetros más conocidos es el denominado **espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (QqQ)**. En esta estructura en tándem el primer y el tercer cuadrupolo son analizadores de masa (Q) y el segundo cuadrupolo (q) opera en el modo RF sirviendo como una celda de colisión. El primer cuadrupolo Q_1 es usado para la selección del ión precursor. El ión precursor es llevado a la celda de colisión (q) donde tiene lugar el proceso de colisión del ión precursor con un gas inerte para dar lugar a iones producto y el tercer cuadrupolo Q_3 proporciona un medio para analizar todos los productos que salen de la celda de colisión. Esta técnica permite operar en cuatro modos de trabajo:

- Escaneo de productos: el primer analizador opera en modo SIM, seleccionando una relación m/z característica del analito; el tercero opera en modo SCAN generando el espectro de fragmentación del ión anterior.
- Escaneo de precursores: ocurre lo contrario del primer caso, el primer cuadrupolo hace un barrido de iones precursores (modo SCAN) y el tercero sólo deja llegar al detector aquellos fragmentos comunes con una determinada relación m/z (modo SIM).
- Pérdidas neutras: ambos cuadrupolos trabajan en modo SCAN.
- Multiple-reaction monitoring (MRM): ambos analizadores operan en modo SIM. Este modo de trabajo es el más sensible y por tanto, el que se emplea en análisis cuantitativo.

Los sistemas híbridos **cuadrupolo tiempo de vuelo (Q-TOF)** consisten en un cuadrupolo que filtra los iones y deja pasar a través de él solamente a aquellos iones seleccionados que se enfocan hacia otro cuadrupolo que actúa como celda de colisión, donde se bombea un gas inerte que choca con los iones produciendo una segunda fragmentación, y finalmente, este segundo cuadrupolo está unido a un analizador de tiempo de vuelo donde se separan los iones producto. Este sistema es una buena aproximación para aumentar la selectividad y evitar así la aparición de falsos positivos. En los últimos años su aceptación ha significado una mejora en el análisis medioambiental.

La aplicación de esta técnica híbrida para análisis permite la confirmación inequívoca de los contaminantes detectados. La eliminación de falsos positivos evita las ambigüedades debido a su técnica característica de generación de espectros de los productos del ion con masas exactas mediante un barrido completo.

4.1.2. Aplicación de HPLC/UPLC-FLD/UV para la determinación de PAHs

La cromatografía líquida en fase reversa es la técnica más utilizada para determinación de PAHs. También se ha empleado en gran medida la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS), pero ésta presenta una cierta desventaja en cuanto a la separación cromatográfica de ciertos pares de picos y con compuestos de alto peso molecular [242] debido a su baja volatilidad.

Los sistemas de detección más empleados para la determinación de PAHs son la fluorescencia (FL) y UV tras su separación mediante HPLC. Una gran ventaja es que estos detectores convencionales no son destructivos de la muestra por lo que existe la posibilidad de colocarlos en serie y hacer la determinación mediante estas dos vías en una misma inyección. A continuación, en la **Tabla II.B.16** se muestran algunos ejemplos recientes del empleo HPLC acoplado a detectores convencionales.

Tabla II.B.16. Resumen de las condiciones empleadas en la bibliografía para el análisis de PAHs en diferentes matrices empleando la cromatografía líquida acoplada a FL/UV como método de determinación.

Analito	Matriz	Preparación de muestra	Separación	LOQ (ng L ⁻¹)	Ref.
16 PAHs EPA ^a	Leche animal (cabra y vaca) Leche vegetal (soja, almendra, arroz)	ELL	HPLC-FD	0.66-33.3 ^e	[243]
16 PAHs EPA (sin Ace)	Agua (río y lago)	SBSE-UALD ^d	HPLC-FD	0.05-2.94	[203]
FEN, BaA, CRIS, BbF, BaP, DBahA	Café y té	Magnetic-SPE	HPLC-FD		[244]
PAH4 ^b y PAH8 ^c	Miel	HELL	U(H)PLC-PDA	0.02-0.04 ^e	[245]
BbF BkF BaP BghiP DBahA BaA I123cdP	Café instantáneo	SPE	HPLC-FD	0.04-0.2	[246]
16 PAHs EPA ^a	Agua de lluvia	SBSE	HPLC-FD	0.2-1.5	[208]

^a 16 PAHs designados por la EPA: Ace, Acy, Flu, Naft, Ant, Fluor, Fen, BaA, BbF, BkF, Cris, Pir, BghiP, BaP, DBahA, I123cdP

^b PAH 4: BaP, Cris, BaA, BbF

^c PAH8: PAH 4 + BkF, BaP, DBahA, I123cdP

^d UALD: ultrasonic assisted liquid desorption

^e µg L⁻¹

4.1.3. Aplicación de LC-MS/MS para la determinación de COXIBs

De acuerdo a los trabajos disponibles, la técnica analítica más recomendada para el análisis de compuestos farmacológicos es la LC-MS/MS. Se trata de una técnica altamente fiable para la identificación de los compuestos, aunque cabe la posibilidad de la existencia de efectos de matriz durante la ionización y de ahí la necesidad de una buena selección de patrón interno marcado isotópicamente o el empleo de adiciones estándar para corregir dichos errores [247].

Los NSAIDs están entre el grupo de fármacos más empleados por los humanos en todo el mundo. Entre ellos, cabe destacar los NSAIDs de carácter ácido, como el ibuprofeno, diclofenaco, ketoprofeno y el naproxeno que han generado un gran interés debido a su ya comentado y elevado consumo por todo el mundo y sus propiedades físico-químicas y toxicológicas [248].

Hasta la fecha, para los COXIBs no se han encontrado métodos encaminados a su determinación en matrices medioambientales, ni siquiera en métodos multianalito, aunque se ha comentado la necesidad de su estudio. No obstante, para casos enfocados en el ámbito hospitalario (fluidos biológicos), sí se llevaron a cabo varios desarrollos metodológicos con cromatografía líquida acoplada tanto a detectores de masas como de fluorescencia.

En el caso de un método desarrollado en HPLC-MS/MS Werner y col. [249] seleccionaron dos COXIBs: etoricoxib y valdecoxib. La matriz de estudio fue el plasma humano siendo el método de extracción escogido la LLE. La técnica analítica está basada en HPLC de fase reversa con una interfase de ionización química a presión atmosférica (APCI) en positivo acoplada a una trampa de iones (*QqLIT*, *LIT*: *linear ion trap*) que opera en modo masas en modo tándem y las transiciones de ambos compuestos se registraron mediante *Selected Reaction Monitoring* (SRM). Los límites de cuantificación bajos (*lower limit of quantification*, LLOQ) se sitúan entre los 5 y 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ para valdecoxib y etoricoxib, respectivamente.

Otros métodos con detectores convencionales como el FL fueron utilizados en este campo y en el análisis de muestras biológicas. Por ejemplo en la **Tabla II.B.17** se adjuntan un par de trabajos:

Tabla II.B.17. Resumen de las condiciones empleadas en la bibliografía para la determinación de COXIBs en matrices biológicas empleando LLE.

Analitos ^a	Matriz	Extracción	Separación	Columna	LLOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Ref.
ETC, VLD, CLC	Plasma humano	LLE	HPLC-UV	Kromasil KR 100-5C ₁₈ (4.6 × 250mm, 5 μm)	0.1	[250]
LMC ^b	Plasma humano	LLE	HPLC-UV	CC 125 Nucleosil 120-3 C ₈ (4.6 × 125mm, 3 μm)	0.01	[159]

^a Sólo se recogen los analitos estudiados en esta Tesis

^bLMC:Lumiracoxib





BIBLIOGRAFÍA

- [1] S.K. Kaytar, R. Agarwal, H. Mukhtar, Handbook of Chromatography: Liquid Chromatography of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, EDS. Rathore, H.S. and Sherma, J., CRC Press, Boca Raton, Florida (1993).
- [2] A. Wick, N. Haus, B. Sukkariyah, K. Haering, W. Daniels, Remediation of PAHs-contaminated soils and sediments: a literature review. CSES Department, internal research document (2011).
- [3] D. W. Connell, Basic Concepts of Environmental Chemistry, Taylor & Francis Group, Boca Ratón, New York (2005).
- [4] A.K. Haristash, C.P. Kaushik, Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): a review, Journal of Hazardous Materials 169 (1-3) (2009) 1-15.
- [5] M. Zender, Physical and chemical properties of polycyclic aromatic hydrocarbons, A. Bjorseth (ed.), Handbook of polycyclic aromatic hydrocarbons. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. (1983) 1-26.
- [6] J.L. Capelo, M.M. Galesio, G.M. Felisberto, C. Vaz, J. Costa Pessoa, Micro-fused ultrasonic solid-liquid extraction (muFUSLE) combined with HPLC and fluorescence determination for PAHs in sediments: optimization and liking with the analytical minimalism concept, Talanta 66 (5) (2005) 1272-1280.
- [7] A. Chahin, Y.P. Guiavarc'h, M.A. Dziurla, H. Toussaint, C. Feidt, G. Rychen, 1-Hydroxypyrene in Milk and Urine as a Bioindicator of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon exposure of ruminants, Journal of Agricultural and Food Chemistry 56 (5) (2008) 1780-1786.
- [8] H.Yu, Environmental carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons: photochemistry and phototoxicity, Journal of Environmental Science and Health, Part C, 20 (2002) 149-183.
- [9] P.Fu. Peter, X. Qingsu, S. Xin, Y. Hongtao, Phototoxicity and Environmental Transformation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)-Light-Induced Reactive Oxygen Species, Lipid Peroxidation and DNA Damage, Journal of Environmental Science and Health, Part C, 30 (2012) 1-41.

- [10] R. Dabestani, I.N. Ivanov, *A compilation of physical, spectroscopy and photophysical properties of polycyclic aromatic hydrocarbons*, Photochemistry and Photobiology 70 (1999) 10-34.
- [11] C. Mastandera, C. Chichizola, B. Ludueña, H. Sánchez, H. Álvarez, A. Gutiérrez, *Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores biológicos*, Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana 39 (1) (2005) 27-36.
- [12] R.G. Harvey, *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, D. Wiley-VCH, Inc. Chicago (1997).
- [13] S. Chen, B. Su, J.E. Chang, K.L. Huang, L.T. Hsien, J.C. Huang, W.J. Lin, C.C. Lin, *Emissions of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from the pyrolysis of scrap tires*, Atmospheric Environment 41 (2007) 1209-1220.
- [14] K. Ravindra, E. Wanters, S.K. Taygi, S. Mor, R. van Grieken, *Assessment of air quality after the implementation of NCG as fuel in public transport in Delhi, India*, Environmental Monitoring and Assessment 115 (2006) 405-417.
- [15] L. Buyewry-Kyu, V. Tuan Vu, *Sources, distribution and toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in particulate matter*, DOI: 10.577/10045 (2010).
- [16] C.E. Boström, P. Gerde, A. Hanberg, *Cancer, risk assessment, indicators and guidelines for PAHs in the ambient air*, Environmental Health Perspectives 110 (supl.3) (2002) 451-488.
- [17] M. Lodovici, P. Dolara, C. Casalini, A. Ciapellano, G. Testolin, *Polycyclic hydrocarbon contamination in the Italian diet*, Food Additives and Contaminants 12 (5) (1995) 703-713.
- [18] A. Ramesch, S.A. Walker, D.B. Hood, M.D. Guille, K. Schneider, *Bioavailability and risk assessment of orally ingested polycyclic aromatic hydrocarbons*, International Journal of Toxicology 23 (5) (2004) 301-333.
- [19] V. Bansal, Ki-Hyun Kim, *Review of PAH contamination in food products and their health hazards*, Environment International 84 (2015) 26-38.
- [20] Y. Zang, X. Tao, *Global atmosphere emission inventory of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) for 2004*, Atmospheric Environment 43 (2009) 812-819.
- [21] H. Shen, Y. Huang, R. Wang, D. Zhu, W. Li, G. Shen, B. Wang, Y. Zhang, Y. Chen, Y. Lu, *Global atmospheric emissions of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from 1960 to*

- 2008 and future predictions, Environmental Science and Technologies 47 (2013) 6415-6424.
- [22] P. Pott, Chirurgical observations relative to the cataract, the polypus of the nose, the cancer scrotum, the different kinds of ruptures and mortification on toes and feet, Hawkes, Clack and Collins, London (1775).
- [23] IARC (Internal Agency for Research on Cancer). Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures, Monographs Evaluation Carcinogenic Risk in Human 92 (2010) 765-771.
- [24] US EPA (Environmental Protection Agency). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PHAs)-EPA fact sheet. Washington (DC): National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development (2008).
- [25] M. Dennisenko, A. Pao, M. Tang, Preferential formation of Benzo(a)Pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53, Science 274 (1996) 430-432.
- [26] D. Krewski, T. Thorslund, J. Withey, Carcinogenic risk assessment of complex mixtures, Toxicology and Industrial Health 5 (1989) 851-867.
- [27] Comisión Europea, 2011. Reglamento (UE) Nº 836/2011 de la comisión del 19 de agosto de 2011 por el que se modifica el Reglamento (CE) Nº 333/2007 por el que se establecen los métodos de muestreo y análisis para el control oficial de Benzo(a)Pireno en los productos alimentarios.
- [28] H.I. Abdel-Shafy, M.S.M. Mansour, A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: sources, environmental impact, effect on human health and remediation, Egyptian Journal of Petroleum (2015) <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.011>.
- [29] L.L. Sloss, I.M. Smith, Environmental effects on Organic Compounds from coal utilisation, IEA Coal Research, Reino Unido (1993).
- [30] M.J.S. Dewar, A molecular-orbital theory of organic chemistry. VI. Aromatic substitution and addition, Journal of American Chemistry Society 74 (1952) 3357-3363.
- [31] J.G. Calvert, R. Atkinson, K.H. Becker, R.M. Kamens, J.H. Seinfeld, T.J. Wallington, G. Yardwood, The mechanism of atmospheric oxidation of aromatic hydrocarbons, Oxford University Press, Oxford (2002).

- [32] R. Atkinson, J. Arey, Mechanism of the gas-phase reactions of aromatic hydrocarbons and PAHs with OH and NO₃ radicals, *Polycyclic Aromatic Compounds* 27 (2007) 15-40.
- [33] R.E. Cochran, N. Dongari, H. Jeong, J. Beránek, S. Haddadi, J. Shipp, A. Kubátová, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons and their oxy-, nitro-, and hydroxy-oxidation products, *Analytica Chimica Acta* 740 (2012) 93-103.
- [34] N. Jariyasopit, M. McIntosh, K. Zimmermann, J. Arey, R. Atkinson, P. Ha-Yeon Cheong, R.G. Carter, T. Yu, R.H. Dashwood, S.L. Massey Simonich, Novel Nitro-PAHs Formation from Heterogeneous reactions of PAHs with NO₂, NO₃/N₂O₅ and OH radicals: Prediction, laboratory studies and mutagenicity, *Environmental Science and Technology* 48 (2014) 412-419.
- [35] K. Zimmermann, R. Atkinson, J. Arey, Y. Kojima, K. Inazu, Isomer distributions of molecular weight 247 and 273 nitro-PAHs in ambient samples, NIST diesel SRM, and from radical-initiated chamber reactions, *Atmospheric Environment* 55 (2012) 431-439.
- [36] K. Zimmermann, N. Jariyasopit, S.L. Massey Simonich, S. Tao, R. Atkinson, J. Arey, Formation of nitro-PAHs from the heterogeneous reaction of ambient particle-bound PAHs with N₂O₅/NO₃/NO₂, *Environmental Science and Technology* 47 (2013) 8434-8442.
- [37] R.M. Kamens, J. Guo, Z. Guo, S.R. McDow, Polynuclear aromatic hydrocarbon degradation by heterogeneous reactions with N₂O₅ on atmospheric particles, *Atmospheric Environment* 24 (1990) 1161-1173.
- [38] S. Delmas, J.F. Muller, Use of FTMS laser microprobe for the in situ characterization of nitro-PAHs in particles, *Analysis* 20 (1992) 165-170.
- [39] H. Bamford, J.E. Baker, Nitro-polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations and sources in urban and suburban atmospheres of the Mid-Atlantic region, *Atmospheric Environment* 37 (2003) 2077-2091.
- [40] A. Albinet, E. Leoz-Garziandia, H. Budzinski, E. Villenave, Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), nitrated and oxygenated PAHs in ambient air of Marseilles area (South of France): Concentrations and sources, *Science of total Environment* 384 (2007) 280-292.

- [41] S.D. Warner, J.P. Farant, I.S. Butler, Photochemical degradation of selected nitropolycyclic aromatic hydrocarbons in solution and adsorberd to solid particles, Chemosphere 54 (2004) 1207-1215.
- [42] O.L. Chapman, D.C. Heckert, J.W. Reasoner, S.P. Thackaberry, Photochemical transformations. XVIII. Photochemical studies on 9-nitroanthracene, Journal of the American Chemical Society 88 (1996) 5550-5554.
- [43] H.S. Neuman, O. Albrecht, C. van Dorp, I. Zwirner-Baier, Macromolecular adducts caused by Environmental Chemicals, Clinical Chemistry 41 (12) (1995) 1835-1840.
- [44] H. Sugiyama, Effects of sunlight irradiation on the chlorination of pyrene in soil, Japanese Journal and Toxicology and Environmental Health 42 (1996) 32-37.
- [45] T. Ohura, A. Kitazawa, T. Amagai, M. Makino, Occurrence, profiles and photostabilities of chlorinated pycyclic aromatic hydrocarbons associated with particulates in urban air, Environmental Science and Technology 39 (2005) 85-91.
- [46] T. Ohura, A. Kitazawa, T. Amagai, Seasonal variability of 1-chloropyrene on atmospheric particles and photostability in toluene, Chemosphere 57 (2004) 831-837.
- [47] T. Ohura, T. Amagai, M. Makino, Behaviour and prediction of photochemical degradation of polychlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons in cyclohexane, Chemosphere 70 (2008) 2110-2117.
- [48] Y. Horii, G. Ok, T. Ohura, K. Kannanct, Ocurrence and profile of chlorinated and brominated polycyclic aromatic hydrocarbons in waste incinerators, Environmental Science and Technology 42 (2008) 1904-1909.
- [49] J. Ma, Y. Horii, J. Cheng, W. Wang, Q. Wu, T. Ohura, K. Kannan, Chlorinated and parent polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental samples from an electronic waste recycling facility and chemical industrial complex in China, Environmental Science and Technology 43 (2009) 643-649.
- [50] J.L. Sun, H. Zeng, H.G. Ni, Halogenated polycyclic aromatic hydrocarbons in the environment, Chemosphere 90 (2013) 1751-1759.
- [51] M. Oheme S. Mano, A. Mikalsen, Formation and presence of polyhaloqenated and polycyclic compounds in the emissions of small and large scale municipal waste incinerators, Chemosphere 16 (1987) 143-153.

- [52] U.L. Nilsson, C.E. Ostman, Chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons: method of analysis and their occurrence in urban air, Environmental Science and Technology 27 (1993) 1826-1831.
- [53] H. Sugiyama, Determination of chlorinated pyrenes in soil by CG-MS, Japanese Journal of Toxicology and Environmental Health 42 (1996) 92-95.
- [54] A. Rubio-Clemente, R.A. Torres-Palma, G.A. Peñuela, Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous environment by chemical treatments: A review, Science of the Total Environment 478 (2014) 201-225.
- [55] G. Guilli, T. Pignata, T. Schilirò, R. Bono, A. La Rosa, D. Travesi, The mutagenic hazards of environmental PM2.5 in Turin, Environmental Research 103 (3) (2007) 168-175.
- [56] E. Galearneau, T.F. bidleman, P. Blanchard , Seasonality and interspecies differences in particle/gas partitioning of PAHs observed by the Integrated Atmospheric Deposition Network (IADN), Atmospheric Environment 40 (2006) 182-197.
- [57] R. Lohmann, G. Lamme, Adsorptive and absorptive contributions to the gas/particle partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons: state of knowledge and recommended parametrization for modeling, Environmental Science and Technology 38 (2004) 3793-3803.
- [58] A. Eiguren-Fernandez, A.H. Miguel, J.R. Froines, S. Thuraitnam, E.L. Avol, Seasonal and spatial variation of polycyclic aromatic hydrocarbons in vapor phase and PM2.5 in Southern Carolina urban and rural communities, Aerosol Science and Technology 38 (2004) 447-455.
- [59] K. Krystyna, P. Bostjan, D. Panagiota, Small combustion: Techniques, Emissions and Measurements for Emission Reduction. European Commission (2007).
- [60] EUD (European Union Directive) (2004) Directive 2004/107/CE of European parliament and of the council. Official Journal of European Union L23.
- [61] EEA (European Environmental Agency) (2014) European Union Emission Inventory Report 1990-2012 Under the UNECE Convention on Long-range Transboundary Air Pollution (LRTAP).

- [62] A. Gubler, D. Wächter, F. Blum, T.D. Bucheli, Remarkably constant PAH concentrations in Swiss soils over the last 30 years, *Environmental Science: Processes and Impacts* 17 (2015) 1816-1828.
- [63] J. Komprda, K. Kubosova, A. Dvorska, M. Scheringer, J. Klanova, I. Holoubek, Application of an unsteady state environmental distribution model to a decadal time series of PAH concentrations in central Europe, *Journal of Environmental Monitoring* 11 (2) (2009) 269-276.
- [64] N.A. Suciú, L. Lamastra, M. Trevisan, PAHs content of sewage sludge in Europe and its use as soil fertilizer, *Waste Management* 41 (2015) 119-127.
- [65] A. Kapanen, M. Vikman, J. Rajasarkka, M. Virta, M. Itavaara, Biotest for the environmental quality assessment of composed sewage sludge, *Waste Management* 33 (2013) 1451-1460.
- [66] S.M. Rhind, C.E. Kyle, H. Ruffie, E. Calmettes, M. Osprey, Z.L. Zhang, D. Hamilt, C. Mackenzie, Short and long-term changes in soil concentrations of selected endocrine disrupting compounds (EDCs) following single or multiple applications of sewage sludge to pastures, *Environmental Pollution* 181 (2013) 262-270.
- [67] EC, 1986. Council Directive 86/278/ECC of 12 June 1986 on the protection of the environment, and in particular of the soil, when sewage sludge is used in agriculture, OJ L 181, 4.7.1986, 6-12.
- [68] C. Sanchez-Brunete, E.Miguel, J.L. Tadeo, Analysis of 27 polycyclic aromatic hydrocarbons by matrix solid-phase dispersion and isotope dilution gas chromatography–mass spectrometry in sewage sludge from the Spanish area of Madrid, *Journal of Chromatography A* 1148 (2007) 219–227.
- [69] I.L. Stevens, G.L. Northcott, G.A. Stern, G.T. Tomy, K.C. Iones, PAHs, PCBs, PCNs, organochlorine, pesticides, synthetic musks, and polychlorinated n- Alkanes in U.K. Sewage sludge: survey results and implications, *Environmental Science and Technology* 37 (2003) 462–467.
- [70] L. Alhafez, N. Muntean, E. Muntean, D. Ristoiu, Polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge from Cluj-Napoca waste water treatment plant, *Bulletin UASMV Agriculture* 70 (2) (2013) 387–389.

- [71] R. Vacha, V. Horvathova, M. Vyslouzřilova, *The application of sludge on agriculturally used soils and the problem of persistent organic pollutants*, Plant Soil Environmental 51 (1) (2005) 12–18.
- [72] M. Blanchard, M.J. Teil, D. Ollivon, L. Legenti, M. Chevreuil, *Polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorobiphenyls in waste waters and sewage sludges from the Paris area (France)*, Environmental Research 95 (2004) 184–197.
- [73] JRC, 2012. Occurrence and levels of selected compounds in European Sewage Sludge Samples, EUR 25598 EN.
- [74] K. Srogi, *Monitoring of Environmental Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: A review*, Environmental Chemistry Letters, 5 (2007) 169-195.
- [75] Directiva 80/778/CEE del Consejo, de 15 de julio de 1980, relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano.
- [76] A.K. Haristaash, *Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review*, Journal of Hazardous Materials 169 (2009) 1-15.
- [77] R.H. Peng, A.S. Xiong, Y. Xue, X.Y. Fu, F. gao, W. Zhao, Y.S. Tian, Q.H. Yao, *Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons*, FEMS Microbiology Reviews 32 (2008) 927-955.
- [78] C. Wang, H. Sun, J. Li, Y. Li, Q. Zhang, *Enzyme activities during degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by white rot fungus Phanerochaete chrysosporium in soils*, Chemosphere 77 (2009) 733-738.
- [79] O.A. Ali S.J. Tarek, *Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from Ismailia Canal water by chlorine, chlorine dioxide and ozone*, Desalination and Water Treatment 1 (2009) 289-298.
- [80] G.S. Brown, L.L. Barton, B.M. Thomson, *Permanganate oxidation of sorbed polycyclic aromatic hydrocarbons*, Waste Management 23 (2003) 737-740.
- [81] A. Kornmüller, U. Wiesmann, *Selective ozonation of polycyclic aromatic hydrocarbons in oil/water emulsions: mass transfer and reaction kinetics*, Water Research 37 (2003) 1023-1032.
- [82] M. Rebola, M.J. Silva, H. Louro, A.M.M. Antunes, S. José, M.H. Rebelo, *Chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons associated with drinking water chlorination-*

- preparation quantification and genotoxicity characterization, Proceedings of ECOpole 2 (2008) 373-379.
- [83] K.L. Shih, J. Lederberg, Chloramine mutagenesis in *Bacillus subtilis*, *Science* 192 (1976) 1141-1143.
- [84] J.S. Miller, D. Olejnik, Ozonaton of polycyclic aromtaic hydrocarbons in water solution, *Science and Engineering* 26 (2004) 453-464.
- [85] U. Von Gunten, Ozonation of drinking water: part I. Oxidation kinetics and product formation, *Water Research* 37 (2003) 733-738.
- [86] A. Alebic-Juretic, T. Cvitas, L. Klansic, Heterogeneous polycyclic aromatic hydrocarbon degradation with ozone on silica gel carrier, *Environmental Science and Technology* 24 (1990) 62-66.
- [87] E. Stanley Manahan, *Environmental Chemistry*, CRC Press Inc. (1994).
- [88] R. Andreozzi, V. Caprio, A. Insola, R. Marotta, Advanced oxidation processes (AOP) for water purification and recovery, *Catalysis Today* 53 (1999) 51-59.
- [89] C. Comninelles, A. Kapalka, S. Malato, S.A. Parsons, I. Poullos, D. Mantzavinos, Advanced oxidation processes for water treatment: advances and trends for R&D, *Journal of Chemical Technology and -Biotechnology* 83 (2008) 769-776.
- [90] L. Zhang, P. Li, Z. Gong, X. Li, Photocatalytic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons on soils surfaces using TiO₂ under UV light, *Journal of Hazardous Materials* 158 (2008) 478-484.
- [91] Y. Wang, C.S. Liu, F.B. Li, C.P. Liu, J.B. Liang, Photodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon pyrene by iron oxide in solid phase, *Journal of Hazardous Materials* 162 (2009) 716-723.
- [92] eur-lex.europa.eu, Official Journal of the European Communities, L331/1 (2001).
- [93] BOE Num. 219, pág. 80582, Sábado 12 de Septiembre de 2015.
- [94] Ministerio de Presidencia (2005): REAL DECRETO 9/2005, de 14 de enero, por el que se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados, Boletín Oficial del Estado 15 (2005) 1833-1843.
- [95] N.A. Suciú, L. Lamastra, M. Trevisan, PAHs content of sewage sludge in Europe and its use as soil fertilizer, *Waste Management* 41 (2015) 119-127.

- [96] Council of the European Community, Working document on Sludge, 3rd Draft, 27 de abril de 2000, Bruselas.
- [97] Unión Europea, Directiva 96/62/CE de 27 de septiembre de 1996 sobre evaluación y gestión de la calidad del aire ambiente, Diario Oficial L296.
- [98] Unión Europea, Directiva 2004/107/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 15 de diciembre de 2004, relativa al arsénico, el cadmio, el mercurio, el níquel y los hidrocarburos aromáticos policíclicos en el aire ambiente, Diario Oficial de la Unión Europea, L23/3.
- [99] Unión Europea, Directiva 2015/1480/CE de la Comisión de 28 de agosto de 2015 por la que se modifican varios anexos de las Directivas 2004/107/CE y 2008/50/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, Diario Oficial L226/4.
- [100] Unión Europea, Decisión de Ejecución de la Comisión de 12 de diciembre de 2011 sobre la calidad del aire, Diario Oficial L335/86.
- [101] Unión Europea, Directiva 2015/1480 de la Comisión de 28 de agosto de 2015, por la que se modifican varios anexos de las Directivas 2004/107/CE y 2008/50/CE del Parlamento Europeo y del Consejo en los que se establecen las normas relativas a los métodos de referencia, la validación de datos y la ubicación de los puntos de muestreo para la evaluación de la calidad del aire ambiente.
- [102] Real Decreto 665/1997 del 2 de mayo de 1997, publicado en el BOE nº 124 (24 mayo de 1997).
- [103] A. Agudo (Instituto catalán de oncología), Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP): Acercamiento a su problemática como riesgo laboral, Secretaría de Salud Laboral y Medio Ambiente MCA-UGT (2010).
- [104] G. Born, C. Patrono, Antipatelet drugs, British Journal of Pharmacology, 147 (2006) 241-251.
- [105] P.A. Howard, Non steroidal anti-inflammatory drugs and Cardiovascular Risk, Journal of the American College of Cardiology 43 (2004) 519-525.
- [106] J.R. Vane, R.M. Botting, Mechanisms of action of non steroidal antiinflammatory drugs, American Journal of Medical Genetics 104 (suppl 3A) (1998) 2-8.

- [107] R.J. Flower, J.R. Vane, *Inhibitor of prostaglandin synthetase in brain explains the anti-pyretic activity of paracetamol (4-acetamidophenol)*, *Nature* 240 (5381) (1972) 410-411.
- [108] T. Hla, K. Neilson, *Human cyclooxygenase-2 DNA*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 89 (16) (1992) 7384-7388.
- [109] N.V. Chandrasekharan, H. dai, K.L. Roos, N.K. Evanson J. Tomsik, T.S. Elton, D.L. Simmons, *COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure and expression*, *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 99 (21) (2002) 13926-13931.
- [110] B. Cryer, M. Feldman, *Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of widely used non steroidal anti-inflammatory drugs*, *American Journal of Medical genetics* 104 (1998) 413-421.
- [111] S. Shi, U. Klotz, *Clinical use and pharmacological properties of selective COX-2 inhibitors*, *European Journal of Clinical Pharmacology* 64 (2008) 233-252.
- [112] C. Patrono, B. Rocca, *Non steroidal anti-inflammatory drugs: past, present and future*, *Pharmacological Research* 59 (2009) 285-289.
- [113] A. Zarghi S. Arfaei, *Selective COX-2 Inhibitors: A review of their structure-activity relationships*, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 10 (2011) 655-683.
- [114] G. Dannhardt, W. Kiefer, *Cyclooxygenase inhibitors current status and future prospects*, *European Journal of Medicinal Chemistry* 36 (2001) 109-126.
- [115] E.M. Smyth, T. Grosser, M. Wang, Y. Yu, G.A. FitzGerald, *Prostanoids in health and disease*, *The Journal of Lipid Research* 50 (2009) 423-428.
- [116] C.D. Funk, *Prostaglandines and leukotrienes: advances in eicosanoid biology*, *Science* 294 (2001) 1871-1875.
- [117] A.A. Gouda, M.I. Kotb El-Sayed, A.S. Amin, *Spectrophotometric and spectrofluorometric methods for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs: A review*, *Arabian Journal of Chemistry* 6 (2013) 145-163.
- [118] M. Starek, J. Krzek, *A review of analytical techniques for determination of oxicams, nimesulide and nabumetone*, *Talanta* 77 (2009) 925-942.

- [119] S.K. Paulson, J.D. Hribar, N.W.K. Liu, E. Hajdu, R.H. Bible, A. Pierge, A. Karim, Metabolism and excretion of [14C]celecoxib in healthy male volunteers, Drug Metabolism and Disposition 28 (2000) 308-314.
- [120] S.K. Paulson, J.Y. Zhang, A.P. Breau, J.D. Hribar, N.W.K. Liu, S.M. Jessen, Y.M. Lawal, J.N. Cogburn, Pharmacokinetics, tissue distribution, metabolism, and excretion of celecoxib in rats, Drug Metabolism and Disposition 28 (2000) 514- 521.
- [121] M. Sandberg, Ü. Yasar, P. Strömberg, J.O. Höög, E. Eliasson, Oxidation of celecoxib by polymorphic cytochrome P450 2C9 and alcohol dehydrogenase, British Journal of Clinical Pharmacology 54 (2002) 423-429.
- [122] C. Tang, M. Shou, Q. Mei, T.H. Rushmore, A.D. Rodrigues, Major role of human liver microsomal cytochrome P450 2C9 in the oxidative metabolism of celecoxib, a novel cyclooxygenase-II Inhibitor, Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 293 (2000) 453-459.
- [123] T.D. Penning, J.J. Talley S.R. Bertenshaw, J.S. Carter, P.W. Collins, S. Docter, M.J. Graneto, L.F. Lee, J.W. Malecha, Synthesis and Biological Evaluation of the 1,5-Diarylpirazole Class of Cyclooxygenase-2 Inhibitors: Identification of 4-[5-(4-Methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide (SC-58635, Celecoxib), Journal of Medicinal Chemistry 40 (1997) 1347-1365.
- [124] Y. Ma, S. Gao, M. Hu, Quantitation of celecoxib and four of its metabolites in rat blood by UPLC-MS/MS clarifies their blood distribution patterns and provides more accurate pharmacokinetics profiles, Journal of Chromatography B 1001 (2015) 202-211.
- [125] N. Chauret, J.A. Yerguey, C. Brideau, R.W. Friesen, J. Mancini, D. Riendeau, J. Scheigetz, J. Silva, A. Styhler, In vitro metabolism considerations, including activity testing of metabolites, in the discovery and selection of the COX-2 inhibitor etoricoxib (MK-0663), Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 11 (2001) 1059-1062.
- [126] K. Kassahum, I. McIntosh, M. Shou, D.J. Walsh, C. Rodeheffer, D.E. Slaughter L.A. Geer R.A. Halpin, N. Agrawal, A.D. Rodrigues, Role of human liver cytochrome P4503A in the metabolism of etoricoxib, a novel cyclooxygenase-2 selective inhibitor, Drug Metabolism and Disposition 29 (2001) 813-820.

- [127] A.D. Rodrigues, R.A. Halpin, L.A. Geer, D. Cui, E.J. Woolf, C.Z. Matthews K.M. Gottesdiener, P.J. Larson, K.C. Lassetter, N.G.B. Agrawal, *Absorption, metabolism and excretion of etoricoxib, a potent and selective cyclooxygenase-2 inhibitor, in healthy male volunteers*, Drug Metabolism and Disposition 31 (2003) 224-232.
- [128] R.A. Haplin, A.G. Porras, L.A. Geer, M.R. Davis, D. Cui, G.A. Doss, E. Woolf, D. Musson, C. Matthews, R. Mazenko, J.I. Schwartz, K.C. Lassetter, K.P. Vyas, T.A. Baillie, *The disposition and metabolism of rofecoxib, a potent and selective cyclooxygenase-2 inhibitor, in human subjects*, Drug Metabolism and Disposition 30 (2002) 684-693.
- [129] C.E. Cook, M.C. Dickey, H.D. Christensen, *Oxygenated norethindrone derivatives from incubation with beagle liver*, Drug Metabolism and Disposition 2 (1974) 58-64.
- [130] V.R. Jauch, Z. Kopitar, R. Hammer A. Prox, R. Fricke, *Pharmakokinetik and metabolismus des antiphlogistiums S-H 766 beim menschen*, Drug Research 28 (1975) 1947-1954.
- [131] T.A. Billie, R.A. Halpin, B.K. Matuszewski, L.A. Geer, C.M. Chavez-Eng, D. Dean, M. Braun, G. Doss, A. Jones T. Marks, *Mechanistic studies on the reversible metabolism of rofecoxib to 5-hydroxyrofecoxib in the rat. Evidence for transient ring-opening of a substituted 2-furanone derivative using stable isotope labelling techniques*, Drug Metabolism and Disposition 29 (2001) 1614-1628.
- [132] J. Simó Miñana, *Utilización de medicamentos en España y en Europa*, Atención Primaria, 44 (2012) 335-347.
- [133] http://www.whooc.no/ddd/list_of_ddd_for_3_years_revisio/
- [134] A.J. Gacía Milian, L. Alonso Carbonel, P. López Puig, *Situación actual y desafíos del mercado consumidor de medicamento cubano*, Infodir 19 (2014) 50-65.
- [135] Seguridad de AINEs y COXIBs: puesta al día, CADIME: Escuela Andaluza de salud Pública, Volumen 24, nº6 (2008) Boletín terapéutico andaluz.
- [136] Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (Web). Septiembre 2004. Nota informativa Suspensión de comercialización de rofecoxib. Ref. 2004/10.
- [137] F. Ruschitzka, *Painful lessons: COX-2 inhibitors, NSAIDs, and hypertension*, Current Hypertension Report 9 (2007) 41-44.

- [138] L.F. Araujo, M. Soeiro Ade, J. de L. Fernandes, Serrano Júnior, *CV Cardiovascular events: a class effect by COX-2 inhibitors*, Arquivos Brasileiros de Cardiologia 85 (2005) 222–229.
- [139] E.L. Masso González, P. Patrignani, S. Tacconelli, L.A. García Rodríguez, *Variability among non-steroidal antiinflammatory drugs in risk of upper gastrointestinal bleeding*, Arthritis and Rheumatology 62 (2010) 1592-1601.
- [140] T.J. Oscanoa-Espinoza, *Seguridad de los antiinflamatorios no esteroideos*, Revista Médica del Instituto Mexicano de Seguro Social 53 (2015) 172-179.
- [141] S. Trelle, S. Reichenbach S. Wandel, P. Hildebrand, B. Tschannen, P.M. Villiger, *Cardiovascular safety of non-steroidal anti-inflammatory drugs: network meta-analysis* (2011) doi: 10.1136/bmj.c7086.
- [142] P. McGettigan, D. Henry, *Cardiovascular risk with non-steroidal antiinflammatory drugs: systematic review of population-based controlled observational studies*, PLOS Medicine (2011), doi: 10.1371/journal.pmed.1001098.
- [143] J. Martí, D. Camacho-Muñoz, J.L. Santos, I. Aparicio, E. Alonso, *Occurrence of pharmaceuticals compounds in wastewater and sludge from wastewater treatment plants: Removal and ecotoxicological impact of wastewater discharges and sludge disposal*, Journal of Hazardous Materials 239-240 (2012) 40-47.
- [144] D. Camacho-Muñoz, J. Martí J.L. Santos, I. Aparicio, E. Alonso, *Occurrence, temporal evolution and risk assessment of pharmaceutically active compounds in Doñana Park, (Spain)*, Journal of Hazardous Materials 183 (2010) 602-608.
- [145] J. Martí, D. Camacho-Muñoz, J.L. Santos, I. Aparicio, E. Alonso, *Monitoring of pharmaceutically active compounds in Guadalquivir River basin (Spain): occurrence and risk assessment*, Journal of Environmental Monitoring 13 (2011) 2042-2049.
- [146] J. Beausse, *Selected drugs in solid matrices: a review of environmental determination, occurrence and properties of principal substances*, Trends in Analytical Chemistry 23 (2004) 753-761.
- [147] T.A. Ternes, N. Herrmann, M. Bonerz, T. Knacker, H. Siegrist, A. Joss, *A rapid method to measure the solid-water partition coefficient (kd) for pharmaceuticals and musk fragrances in sewage sludge*, Water Research 38 (2004) 4075-4084.

- [148] M. Clara, B. Strenn, M. Ausserleitner, N. Kreuzinger, Comparison of the behaviour of selected micropollutants in a membrane bioreactor and a conventional wastewater treatment plant, Water Science and Technology 50 (2004) 29-36.
- [149] S. Zorita, L. Martensson, L. Mathiasson, Occurrence and removal of pharmaceuticals in a municipal sewage treatment system in the south of Sweden, Science of Total Environment 407 (2009) 2760-2770.
- [150] E. Larsson, A. Rabayah, J.A. Jönson, Sludge removal of nonsteroidal anti-inflammatory drugs during wastewater treatment studied by Direct Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction, Journal of Environmental Protection 4 (2013) 946-955.
- [151] V.G. Samaras, N.S. Thomaidis, A. S. Stasinakis, G. Gatidou, T.D. Lekkas, Determination of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs in wastewater by gas chromatography-mass spectrometry, International Journal of Environmental Analytical Chemistry 90 (2010) 219-229.
- [152] P. Verlicchi, M. Al Aukidy, E. Zambello, Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment- A review, Science of The Total Environment 429 (2012) 123-155.
- [153] H.B. Lee, T.E. Peart, M.L. Svoboda, Determination of endocrine-disrupting phenols, acidic pharmaceuticals, and personal-care products in sewage by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry, Journal of Chromatography A 1094 (2005) 122-129.
- [154] J.B. Quintana, R. Rodil, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez, Multiresidue analysis of acidic and polar organic contaminants in water samples by stir bar sorptive extraction-liquid-desorption-gas chromatography-mass spectrometry, Journal of Chromatography A 1174 (2007) 27-39.
- [155] L.H.M.L.M Santos, M. Gros, S. Rodriguez-Mozaz, C. Delerue-Matos, A. Pena, D. Barceló, M.C.B.S.M. Montenegro, Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: identification of ecological relevant pharmaceuticals, Science of Total Environment 461 (2013) 302-316.
- [156] M. Láven, T. Alsberg, Y. Yu, M. Adolfsson-Erici, H. Sun, Serial mixed-mode cation and anion-exchange solid-phase extraction for separation of basic, neutral and acidic pharmaceuticals in wastewater and analysis by high performance liquid

chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry, Journal of Chromatography A 1216 (2009) 49-62.

[157] A. Togola, H. Budzinski, Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples, Journal of Chromatography A 1177 (2008) 150-158.

[158] P. Jedziniak, T. Szprengier-Juskiewicz, K. Pietruk, E. Sledzinska, J. Zmudzki, Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs and their metabolites in milk by liquid chromatography- tandem mass spectrometry, Analytical and Bioanalytical Chemistry 403 (2012) 2955-2963.

[159] O. Cheremia, K. Brune, B. Hinz, A validated high-performance liquid chromatographic assay for determination of lumiracoxib in human plasma, Biomedical Chromatography 20 (2006) 1033-1037.

[160] H. Jiang, H. Cao, Y. Zhang, D.M. Fast, Systematic evaluation of supported liquid extraction in reducing matrix effect and improving extraction efficiency in LC-MS/MS based bioanalysis for 10 model pharmaceutical compounds, Journal Chromatography B 891-892 (2012) 71-80.

[161] D.C. Harris, Análisis químico cuantitativo, Editorial Reverté, S.A. 3ª Edición (2007).

[162] Analytical Techniques for Scientifics, Comprehensive Sampling and Sample Preparation, Volume 4, Editor-in-chief-Professor J. Pawliszyn (2012).

[163] J. Plotka-Wasyłka, N. Szczepanska, M. de la Guardia, J. Namiesnik, Modern trends in solid phase extraction: New sorbent media, Trends in Analytical Chemistry 77 (2016) 23-43.

[164] N. Gilart, F. Borrull, N. Fontanals, R.M. Marcé, Selective materials for solid-phase extraction in environmental analysis: Review, Trends in Environmental Analytical Chemistry 1 (2014) 8-18.

[165] D. Das, U. Gupta, A.K. Das, Recent developments in solid phase extraction in elemental speciation of environmental samples with special reference to aqueous solutions, Trends in Analytical Chemistry 38 (2012) 163-171.

[166] N. Fontanals, P.A.G. Cormack, R.M. Marcé, F. Borrull, Mixed-mode ion-exchange polymeric sorbents: dual phase materials that improve selectivity and capacity, Trends in Analytical Chemistry 29 (2010) 765-779.

- [167] S. Chigome, N. Torto, Electrospun nanofiber-based solid-phase extraction, Trends in Analytical Chemistry 38 (2012) 21-31.
- [168] A. Wasik, A. Zyglar, A. Kot-wasik, ABC Techniki SPE, Wydawnictwo Politechniki Gdanskiej, Gdansk (2011).
- [169] E.M. Thurman, K. Snavely, Advances in solid-phase extraction disk for environmental chemistry, Trends in Analytical Chemistry 19 (2000) 18-26.
- [170] C. Erger, T.C. Schmidt, Disk-based solid-phase extraction analysis of organic substances in water, Trends in Analytical Chemistry 61 (2014) 74-82.
- [171] C. F. Poole, New trends in solid-phase extraction, Trends in Analytical Chemistry 22 (2003) 362-373.
- [172] A. Zwir-Ferenc, M. Biziuk, Solid phase extraction technique-trends, opportunities and application, Polish Journal of Environmental Studies 5 (2006) 977-690.
- [173] R.E. Majors, New designs and formats in solid-phase extraction simple preparation, LC CG, Europe (2001).
- [174] Q. Sheen, W. Dong, Y. Wang, L. Gong, Z. Dai, H.Y. Cheung, Pipette tip solid-phase extraction and ultra-performance liquid chromatography/mass spectrometry based on rapid analysis of picosides from Picrorhiza scrophulariiflora, Journal of pharmaceutical and biomedical analysis 80 (2013) 136-140.
- [175] T. Du, J. Cheng, M. Wu, X. Wang, H. Zhou, M. Cheng, An in situ immobilized pipette tip solid-phase microextraction method based on molecularly imprinted polymer monolith for the selective determination of difenoconazole in tap water and grape juice, Journal of Chromatography B 951-952 (2014) 104-109.
- [176] F.S. Mirnaghi, Y. Chen, L.M. Sidisky, J. Pawlisyn, Optimization of the coating procedure of high-throughput 96-blade solid microextraction system coupled with LC-MS/MS for analysis of complex samples, Analytical Chemistry 83 (2011) 6018-6025.
- [177] P. Paíga, A. Lolic, F. Hellebuyck, L.H.M.L.M. Santos, M. Correia, C. Delerue-Matos, Development of SPE-UHPLC-MS/MS methodology for the determination of non-steroidal anti-inflammatory and analgesic pharmaceutical in seawater, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 106 (2015) 61-70.
- [178] M.J. Gómez, M. Petrovic, A.R. Fernández-Alba, D. Barceló, Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid

chromatography-tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters, Journal of Chromatography A 1114 (2006) 224-233.

[179] A. Eslami, M.M. Amini, A. Reza-Yazdanbakhsh, N. Rastkari, A. Mohsenei-Bandpei, S. Nasser, E. Piroti, A. Asadi, Occurrence of non-steroidal antiinflammatory drugs in Teheran source water, municipal and wastewater and their ecotoxicological risk assessment, Environmental Monitoring Assessment 187:734 (2015).

[180] M. Farré, M. Petrovic, D. Barceló, Recently developed CG/MS and LC/MS methods for determining NSAIDs in water samples, Analytical and Bioanalytical Chemistry 387 (2007) 1203-1214.

[181] J.Y. Zhang, Y.F. Wang, C. Dudkowski, D.-Ch. Yang, M. Chang, J. Yuan, S.K. Paulson, A.P. Breau, Characterization of metabolites of celecoxib in rabbits by liquid chromatography/tandem mass spectrometry, Journal of Mass Spectrometry 35 (2000) 1259-1270.

[182] J.Y. Zhang, D.M. Fast, A.P. Breau, Development and validation of an automated SPE-LC-MS/MS assay for valdecoxib and its hydroxylated metabolite in human plasma, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 33 (2003) 61-72.

[183] F.M. Lancas, M.E.C. Queiroz, P. Grossi, I.R.B. Olivares, Recent developments and applications of stir bar sorptive extraction: Review, Journal of Separation Science 32 (2009) 813-824.

[184] J.M.F. Nogueira, Novel sorption-based methodologies for static microextraction analysis: A review on SBSE and related techniques, Analytica Chimica Acta 757 (2012) 1-10.

[185] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles, Journal of Microcolumn Separations 11 (1999) 737-747.

[186] C. Bicchi, C. Cordero, E. Liberto, P. Rubiolo B. Sgorbini, F. David, P. Sandra, Dual-phase twistors: A new approach to headspace sorptive extraction and stir bar sorptive extraction, Journal Chromatography A 1094 (2005) 9-16.

[187] W. Liu, H. Wang, Y. Guan, Preparation of stir bar sorptive extraction using sol-gel technology, Journal of Chromatography A 1045 (2004) 8-14.

- [188] N.R. Neng, M.L. Pinto, J. Pires, P.M. Marcos, J.M.F. Nogueira, Development, optimisation and application of polyurethane foams as new polymeric phases for stir bar sorptive extraction, Journal of Chromatography A 1171 (2007) 8-14.
- [189] F. David, B. Tienpont, P. Sandra, Stir-bar sorptive extraction of trace organic compounds from aqueous matrices, LC-CG North America 21 (2003) 108-118.
- [190] A. Prieto, O. Basauri, R. Rodil, A. Usobiaga, L.A. Fernández, Stir-bar sorptive extraction. A review on method optimisation, novel applications, imitations and potential solutions, Journal of Chromatography A 1217 (2010) 2642-2666.
- [191] F.M.C. Portugal, M.L. Pinto, J.M.F. Nogueira, Optimization of polyurethane foams for enhance stir bar sorptive of triazinic herbicides in water matrices, Talanta 77 (2008) 764-773.
- [192] F.M.C. Portugal, M.L. Pinto, J. Pires, J.M.F. Nogueira, Pontentialities of polyurethane foams for trace level analysis of triazinic metabolites in water matrices by stir bar sorptive extraction, Journal of Chromatography A 1217 (2010) 3707-3710.
- [193] C. Blasco, G. Font, Y. Picó, Comparison of microextraction procedures to determine pesticides in oranges by liquid chromatography-mass spectrometry, Journal of Chromatography A 970 (2002) 201-212.
- [194] N. Ochiai, K. Sasamoto, H. Kanda, S. Nakamura, Fast screening of pesticide multiresidues in aqueous samples by dual stir bar sorptive extraction-thermal desorption-low termal mass gas chromatography-mass spectrometry, Journal of Chromatography A 1130 (2006) 83-90.
- [195] W. Guan, Y. Wang, F. Xu, Y. Guan, Poly(phthalazine ether sulfone ketone) as a novel stationary phase for stir bar sorptive extraction of organochlorine compounds organophosphorus pesticides, Journal of Chromatography A 1071 (2005) 155-162.
- [196] W. Liu, Y. Hu, J. Zhao, Y. Xu, Y. Guan, Determination of organophosphorous pesticides in cucumber and potato by stir bar sportive extraction, Journal of Chromatography A 1095 (2005) 1-7.
- [197] N. Ochiai, K. Sasamoto, H. Kanda, T. Yamagami, F. David, B. Tienpot, P. Sandra, Optimization of a multi-residue screening method for determination of 85 pesticides in selected food matrices by stir bar sorptive extraction and thermal desorption CG-MS, Journal of Separation Science 28 (2005) 1083-1092.

- [198] O. Krüger, G. Christoph, U. Kalbe, W. Berger, Comparison of stir bar sorptive extraction (SBSE) and liquid-liquid extraction (LLE) for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in complex aqueous matrices, *Talanta* 85 (2011) 1428-1434.
- [199] O. Krüger, S. Olberg, R. Senz, F.G. Simon, Comparison of stir bar sorptive extraccion (SBSE) and solid phase microextraction (SPME) for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in complex aqueous soil leachates, *Water Air Soil Pollut* (2015) 226-397.
- [200] P. Popp, C. Bauer A. Paschke, L. Montero, Application of a polysiloxane-based extraction method combined with column liquid chromatography to determine polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental samples, *Analytica Chimica Acta* 504 (2004) 307-312.
- [201] M.S. Garcí-Falcón, B. Cancho-Grande, J. Simal-Gándara, Stirring bar sorptive extraction in the determination of PAHs in drinking waters, *Water Research* 38 (2004) 1679-1684.
- [202] X. Mao, B. Hu, M. He, W. Fan, Stir bar sorptive extraction approaches with home-made portable electric stirrer for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds in environmental water, *Journal of Chromatography A* 1260 (2012) 16-24.
- [203] C. Hu, M. He, B. Chen, C. Zhong, B. Hu, Sorptive extraction using polydimethylsiloxane/metal-organic framework coated stir bars coupled with high performance liquid chromatography-fluorescence detection for the determination of polycylic aromatic hydrocarbons in environmental water samples, *Journal of Chromatography A* 1356 (2014) 45-53.
- [204] G. Roy, R. Vuillemin, J. Guyomarch, On-site determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in seawater by stir bar sorptive extraction (SBSE) and thermal desorption CG-MS, *Talanta* 66 (2005) 540-546.
- [205] B. Kolahgar, A. Hoffmann, A.C. Heiden, Application of stir bar sorptive extraction to the determination of polycyclic aromatic hydrcarbons in water samples, *Journal of Chromatography A* 963 (2002) 225-230.
- [206] C. Yamaguchi W.Y. Lee, A cost effective, sensitive and environmentally friendly sample preparation method for determination of polycylic aromatic hydrocarbons in solid samples, *Journal of Chormatography A* 1217 (2010) 6816-6823.

- [207] W.G. Zuin, L. Montero, C. Bauer, P. Popp, Stir bar sorptive extraction and high-performance liquid chromatography fluorescence-detection for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in Mate teas, Journal of Chromatography A 1091 (2005) 2-10.
- [208] M. Bourdat-Deschamps, J.J. Daudin, E. Barriuso, An experimental design approach to optimise the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons from rainfall water using stir bar sorptive extraction and high performance liquid chromatography-fluorescence detection, Journal of Chromatography A 1167 (2007) 143-153.
- [209] S. Seidi, Y. Yamini, Analytical sonochemistry, developments, applications, and hyphenations of ultrasound in sample preparation and analytical techniques, Central European Journal of Chemistry 10 (2012) 938–976.
- [210] B. Alberto, C. Sánchez-Brunete, A.I. García-Valcárcel, R.A. Pérez, J.L. Tadeo, Ultrasound-assisted extraction of emerging contaminants from environmental samples, Trends in Analytical Chemistry 71 (2015) 110-118.
- [211] Y. He, X. Xiao, Y. Cheng, G. Li, Progress in field-assisted extraction and its application to solid sample analysis, Journal of Separation Science 39 (2016) 177-187.
- [212] S. Herranz, M.C. Moreno-Bondi, M.D. Marazuela, Development of a new sample pretreatment procedure based on pressurized liquid extraction for the determination of fluoroquinolone residues in table eggs, Journal of Chromatography A 1140 (2007) 63-70.
- [213] L. Sanchez-Prado, C. Garcia-Jares, T. Dagnac, M. Llompарт, Microwave-assisted extraction of emerging pollutants in environmental and biological samples before chromatographic determination, Trends in Analytical Chemistry 71 (2015) 119-143.
- [214] V. Camel, Recent extraction techniques for solid matrix-supercritical fluid extraction pressurized fluid extraction and microwave assisted extraction: their potential and pitfalls, Analyst 126 (2001) 1182-1193.
- [215] S.A. Barker, A.R. Long, C.R. Short, Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion, Journal of Chromatography A (1989) 353-361.
- [216] M. García-López, P. Canosa, I. Rodríguez, Trends and recent applications of matrix solid-phase: Review, Analytical and Bioanalytical Chemistry 391 (2008) 963-974.

- [217] J. Escobar-Arranz, L. Ramos, *The latest trends in the miniaturized treatment of solid samples*, Trends in Analytical Chemistry 71 (2015) 275-281.
- [218] A.L. Cspriotti, C. Cavaliere, P. Foglia, R. Samperi, S. Stampachiacchiere, S. Ventura, A. Laganà, *Recent advances and developments in matrix solid-phase dispersion*, Trends in Analytical Chemistry 71 (2015) 186-193.
- [219] A. Iparraguirre, R. Rodil, J.B. Quintana, B. Buizkarguenaga, A. Prieto, O. Zuloaga, R.Cela, L.A. Fernández, *Matrix solid-phase dispersion of polybrominated diphenyl ethers and their hydroxylated and methoxylated analogues in lettuce, carrot and soil*, Journal of Chromatography A 1360 (2014) 57-65.
- [220] N. Rodríguez-González, M.J. González-Castro, E. Beceiro-González, S. Muniategui-Lorenzo, *Development of a Matrix Solid-Phase Dispersion methodology for the determination of triazine herbicides in mussels*, Food Chemistry 173 (2015) 391-396.
- [221] N. Negreira, I. Rodríguez, R. Rodil, E. Rubí, R. Cela, *Optimisation of matrix solid-phase dispersion conditions for UV filters determination in biota*, International Journal of Environmental Analytical Chemistry 93 (2013) 1174-1188.
- [222] G. Suresh, T. Venkat Rao, A. Ramesh, *A miniaturised matrix solid-phase dispersion extraction method for the simultaneous determination of pyrethroid insecticides in biological samples by CG-MS*, Journal of Pharmacy and Chemistry 9 (2015) 1-7.
- [223] S.A. Barker, *Matrix solid-phase dispersion*, Journal of Chromatography A 885 (2000) 115-127.
- [224] J. Casado, G. Castro, I. Rodríguez, M. Ramil, R.Cela, *Selective extraction of antimycotic drugs from sludge samples using matrix solid-phase dispersion followed by on-line clean-up*, Analytical and Bioanalytical Chemistry 407 (2015) 907-917.
- [225] M.T. Pena, M.C. Casais, M.C. Mejuto, R. Cela, *Development of a matrix solid-phase dispersion for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge samples*, Analytica Chimica Acta 626 (2008) 155-165.
- [226] R. Celano, I. Rodriguez, R.Cela, L. Rastrelli, A.L. Piccinelli, *Liquid chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry quantification and screening of organophosphate compounds in sludge*, Talanta 118 (2014) 312-320.

- [227] J. Casado, I. Rodríguez, I. Carpenheiro, M. Ramil R. Cela, Gas Chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry determination of benzotriazole ultraviolet stabilizers in sludge samples, Journal of Chromatography A 1293 (2013) 126-132.
- [228] K. Aguilar-Arteaga, J.A. Rodriguez, J.M. Miranda, J. Medina, E. Barrado, Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in wastewaters by magnetic matrix solid phase dispersion-HPLC, Talanta 80 (2010) 1152-1157.
- [229] L.S. Ettre, Nomenclature for chromatography, Pure and Applied Chemistry 65 (4) (1993) 819-872.
- [230] M.P. Villar Navarro, Determinación y distribución de hidrocarburos aromáticos policíclicos en el tratamiento de lodos de EDARs, Departamento de Química Analítica, Sevilla (2004).
- [231] Douglas A. Skoog, Donald M. West; F. James Holler, Stanley R. Crouch, Fundamentos de Química Analítica (ed 8). Thomson editors (2005).
- [232] B.H.Chen, C.Y.Wang, C.P. Chiu, Evaluation of Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Meat Products by liquid Chromatography, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44 (8) (1996) 2244-2251.
- [233] T. Wenzl, R. Simon, J. Kleiner, E. Anklam, Analytical methods for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in food and environment needed for new legislation in the European Union, Trends in Analytical Chemistry, 25 (7) (2006) 716-725.
- [234] G.G. Guilbaut, Practical Fluorescence, University of New Orleans, Louisiana (2ªed.) (1990).
- [235] D.M. Desiderio and N.M. Nibbering, Fundamentals of contemporary mass spectrometry, Wiley-Interscience Series on Mass Spectrometry, Series Editors (2007).
- [236] R.D. Smith, J.A. Loo, R.R. Ogorzalek Loo, M. Busman and H.R. Udseth, Principles and practice of electrospray ionization-mass spectrometry for large polypeptides and proteins, Mass Spectrometry Review 10 (5) (1991) 359-452.
- [237] C. Dass, Recent developments and applications of high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry, Current Organic Chemistry 3 (2) (1999) 193-209.
- [238] P.H. Dawson, Quadrupole mass analyzer: performance, design and some recent applications, Mass Spectrometry 5 (1) (1986) 1-37.

- [239] P.E. Miller, M. Bonner Denton, *The quadrupole mass filter, basic operating concepts*, Journal of Chemical Education 63 (7) (1986) 617-622.
- [240] M. Gros, M. Petrovic, D. Barcelo, *Multi-residue analytical methods using LC-tandem Ms for the determination of pharmaceuticals in environmental and wastewater samples: A review*, Analytical and Bioanalytical Chemistry 386 (4) (2006) 941-952.
- [241] W.E. Stephen, *A pulsed mass spectrometer with time dispersion*, Physical Review 69 (1946) 691.
- [242] W.R. Biggs, J.C. Fetzer, *Analytical techniques for large polycyclic aromatic hydrocarbons: A review*, Trends in Analytical Chemistry 15 (1996) 196-205.
- [243] A.M. Girelli, D. Sperati, A.M. Tarola, *Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in Italian milk by HPLC fluorescence detection*, Food Additives and Contaminants: Part A 31 (2014) 703-710.
- [244] Y. Shi, H. Wu, C. Wang, X. Guo, J. Du, L. Du, *Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in coffee and tea samples by magnetic solid-phase extraction coupled with HPLC-FLD*, Food Chemistry 199 (2016) 75-80.
- [245] A. Koltsakidou, C.K. Zacharis, K. Fytianos, *A validated liquid chromatographic method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in honey after homogeneous liquid-liquid extraction using hydrophilic acetonitrile and sodium chloride as mass separating agent*, Journal of Chromatography A 1337 (2015) 46-54.
- [246] M.S. García-Falcón, B. Cancho-Grande, J. Simal-Gándara, *Minimal clean-up and rapid determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in instant coffee*, Food Chemistry 90 (2005) 643-647.
- [247] C. Toledo-Neira, A. Álvarez-Lueje, *Ionic liquids for the improving extraction of NSAIDs in water samples using dispersive liquid-liquid microextraction by high performance liquid chromatography-diode-array-fluorescence detection*, Talanta 134 (2015) 619-626.
- [248] K.P. Singh, P. Rai, A.K. Singh, P. Verma, S. Gupta, *Occurrence of pharmaceuticals in urban wastewater of north of Indian cities and risk assessment*, Environmental Monitoring and Assessment 186 (2014) 6663-6682.

- [249] U. Werner, D. Werner, B. Hinz, G. Lambrecht, K. Brune, *A liquid chromatography-mass spectrometry method for the quantification of both etoricoxib and valdecoxib in human plasma*, Biomedical Chromatography 19 (2005) 113-118.
- [250] V.V.Pavan Kumar, M.C.A. Vinu, A.V. Ramani, R. Mullangi, N.R. Srinivas, *Simultaneous quantitation of etoricoxib, salicylic acid, valdecoxib, ketoprofen, nimesulide and celecoxib in plasma by high performance liquid chromatography with UV detection*, Biomedical Chromatography 20 (2006) 15-132.





Tabla II.1. Propiedades físico-químicas de los 24 PAHs estudiados	16
Tabla II.2. Inventario de emisiones de PAHs	20
Tabla II.3. Carcinogenicidad de los PAHs.....	23
Tabla II.4. Niveles máximos de Benzo[a]Pireno en alimentos.....	25
Tabla II.5. Concentración de PAHs en muestras de lodo	35
Tabla II.6. Concentración de PAHS en aguas superficiales	36
Tabla II.7. Estándares control de calidad para PAHs en aguas superficiales	42
Tabla II.8. Clasificación de los NSAIDs según su selectividad para la COX	49
Tabla II.9. Clasificación y diferencias básicas de los COXIBs.....	49
Tabla II.10. Propiedades físico-químicas de los COXIBs estudiados	51
Tabla II.11. Características farmacocinéticas de los COXIBs.....	54
Tabla II.A.12. Determinación de COXIBs en muestras biológicas mediante SPE	80
Tabla II.A.13. Determinación de coxibs en leche mediante SPE	81
Tabla II.A.14. Métodos bibliográficos de análisis de PAHs aplicando SBSE	89
Tabla II.A.15. Comparación de LODs para PAHs en agua.....	90
Tabla II.B.16. Métodos bibliográficos de determinación de PAHs con LC-FD/UV	111
Tabla II.B.17. Métodos bibliográficos de determinación de COXIBs empleando ELL.....	113

Figura II.1. Estructura molecular de algunos PAHs de interés	13
Figura II.2. Posible mecanismo de formación del Benzo[a]Pireno	17
Figura II.3. Perfiles de las emisiones de PAHs (Gg) a nivel mundial	21
Figura II.4. Proceso de mutagénesis del ADN por el Benzo[a]Pireno	26
Figura II.5. Mecanismo general de nitración de PAHs	27
Figura II.6. Orientación del grupo nitro respecto a la parte aromática	28
Figura II.7. Activación metabólica de nitro-PAHs con ADN y hemoglobina.....	28
Figura II.8. Mecanismo de fotooxidación del Antraceno y el Benzo[a]Antraceno	29
Figura II.9. Fuentes de emisión de PAHs y los principales medios de contaminación	32
Figura II.10. Subproductos de transformación de la fotólisis del antraceno.....	40
Figura II.11. Clasificación de los NSAIDs según sus estructuras químicas.....	48
Figura II.12. Inhibición de la actividad plaquetaria de la COX-1 y la COX-2.....	50
Figura II.13. Conversión del Diclofenaco en Lumiracoxib	52
Figura II.14. Ruta metabólica del celecoxib	55
Figura II.15. Ruta metabólica propuesta para el etoricoxib	56
Figura II.16. Esquema representativo del metabolismo del rofecoxib	58
Figura II.17. Consumo total de AINEs en España	60
Figura II.18. Consumo de COXIBs en España	61
Figura II.19. Riesgo digestivo inducido por NSAIDs: Comparación	62
Figura II.A.20. Etapas del proceso de SPE.....	71
Figura II.A.21. Estructura del adsorbente Oasis HLB	73
Figura II.A.22. Evolución metodológica de la extracción en fase sólida	78
Figura II.A.23. Dispositivo SBSE.....	82
Figura II.A.24. Modos de extracción en SBSE	86
Figura II.A.25. Formatos comerciales de PDMS	87
Figura II.A.26. Etapas del proceso de MSPD.....	95
Figura II.B.27. Analizador cuadrupolar simple	107
Figura II.B.28. Analizador de tiempo de vuelo	108



III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



En la sección de Resultados y Discusión de la presente Tesis se van a describir de forma esquemática y concisa los pasos que se han realizado para llevar a cabo el desarrollo de metodologías analíticas para la determinación de dos familias de contaminantes: la primera de ellas designados como contaminantes persistentes (PAHs) y la segunda como contaminantes emergentes (COXIBs). Así mismo se recogen una serie de publicaciones científicas fruto de dicho trabajo.

A. CONTAMINANTES PERSISTENTES: PAHs

A lo largo de los últimos años, los hidrocarburos aromáticos policíclicos han llegado a ser una de las familias de contaminantes medioambientales más estudiadas. Su formación se debe básicamente a dos fuentes: la natural, que engloba los yacimientos de carbón, petróleo y alquitrán; y la humana a través de actividades y procesos industriales. Desde el punto de vista histórico, fueron los primeros agentes químicos en ser reconocidos como causantes de tumores malignos en los seres humanos. Debido a su potencial carcinogenicidad y mutagenicidad, la contaminación en el medioambiente acuático ha suscitado un crecimiento del interés y preocupación por parte de organismos internacionales como la OMS o la EPA, cuya tarea se centra en controlar estas sustancias en el medio ambiente.

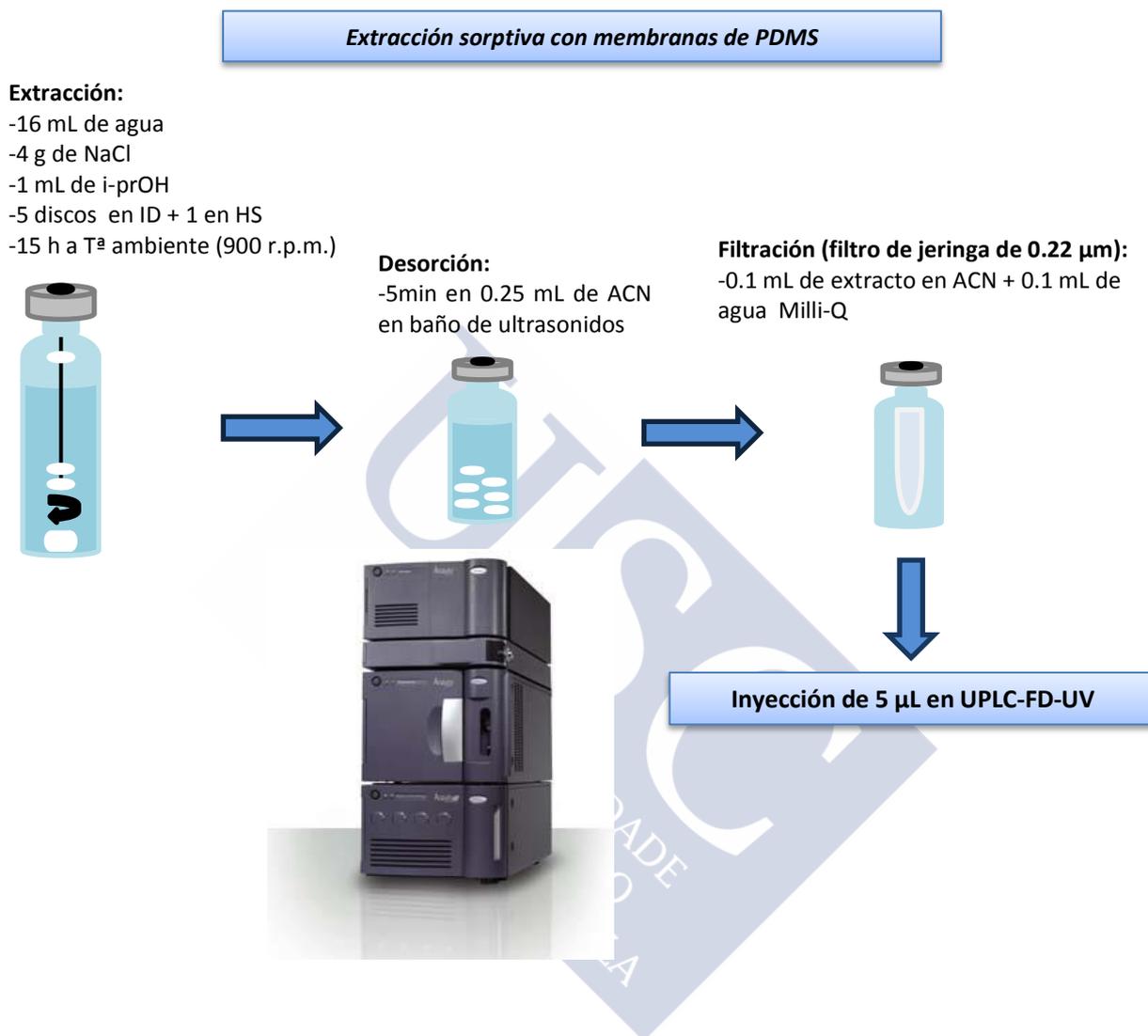
La principal limitación que presenta este tipo de compuestos en muestras acuosas es su baja polaridad, presentando un carácter altamente hidrófobo. Un factor importante a la hora de ejecutar experimentos es que éstos tienden a quedarse adsorbidos en los recipientes que los contienen, generalmente de vidrio, dando lugar a importantes errores en los resultados debido a la pérdida de dichos analitos. Una solución alternativa a este problema es la adición de una pequeña cantidad de disolvente orgánico.

En el primer trabajo realizado se pretendió desarrollar una metodología de bajo coste alternativa a la tradicional extracción líquido-líquido (ELL), a la extracción en fase sólida (SPE) o la microextracción en fase sólida (SPME). Así pues, la técnica que emplea dispositivos poliméricos como fase extractante resultó en una opción simple y barata,

ya que estos soportes sólidos se encuentran disponibles en el mercado en diferentes formatos y cantidades. Debido a su bajo coste, es posible utilizar uno nuevo en cada análisis y evitar de esta forma problemas de contaminación cruzada. En esta Tesis se planteó el uso de láminas de PDMS, cuyo formato fue establecido en discos de un tamaño y volumen determinado colocándolos de manera estratégica en los modos inmersión directa (ID) y espacio de cabeza (EC) simultáneamente. La extracción de 24 PAHs, 16 de ellos designados como contaminantes prioritarios por la EPA y los “15+1” establecidos por la UE, se ha realizado en diferentes muestras acuosas, entre ellas aguas potables y procedentes de diferentes ríos. Es importante destacar la simplicidad de la técnica, aunque los tiempos de equilibrio son de aproximadamente 9 horas, puesto que permite realizar muchas muestras simultáneamente empleando poco material instrumental y con escasa vigilancia por parte del trabajador.

Los límites de cuantificación alcanzados se encuentran por debajo de los permitidos por la legislación internacional utilizando muy poco volumen de muestra (16 mL) y sin observar problemas de efectos de matriz. Aprovechando que esta familia de compuestos posee propiedades fluorescentes, se optó por su determinación mediante LC-FD-UV.

Figura III.1. Esquema representativo de la metodología empleada para la determinación de los 24 PAHs empleando la extracción sorptiva con membranas de PDMS.



METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS
POLICÍCLICOS

Publicación III.1

“DEVELOPMENT OF A NEW SORPTIVE EXTRACTION METHOD BASED ON
SIMULTANEOUS DIRECT AND HEADSPACE SAMPLING MODE FOR THE SCREENING OF
POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN WATER SAMPLES”

Sara Triñanes, M^a Teresa Pena, M^a Carmen Casais, M^a Carmen Mejuto

Talanta 132 (2015) 433-442

Enlace: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2014.09.044>





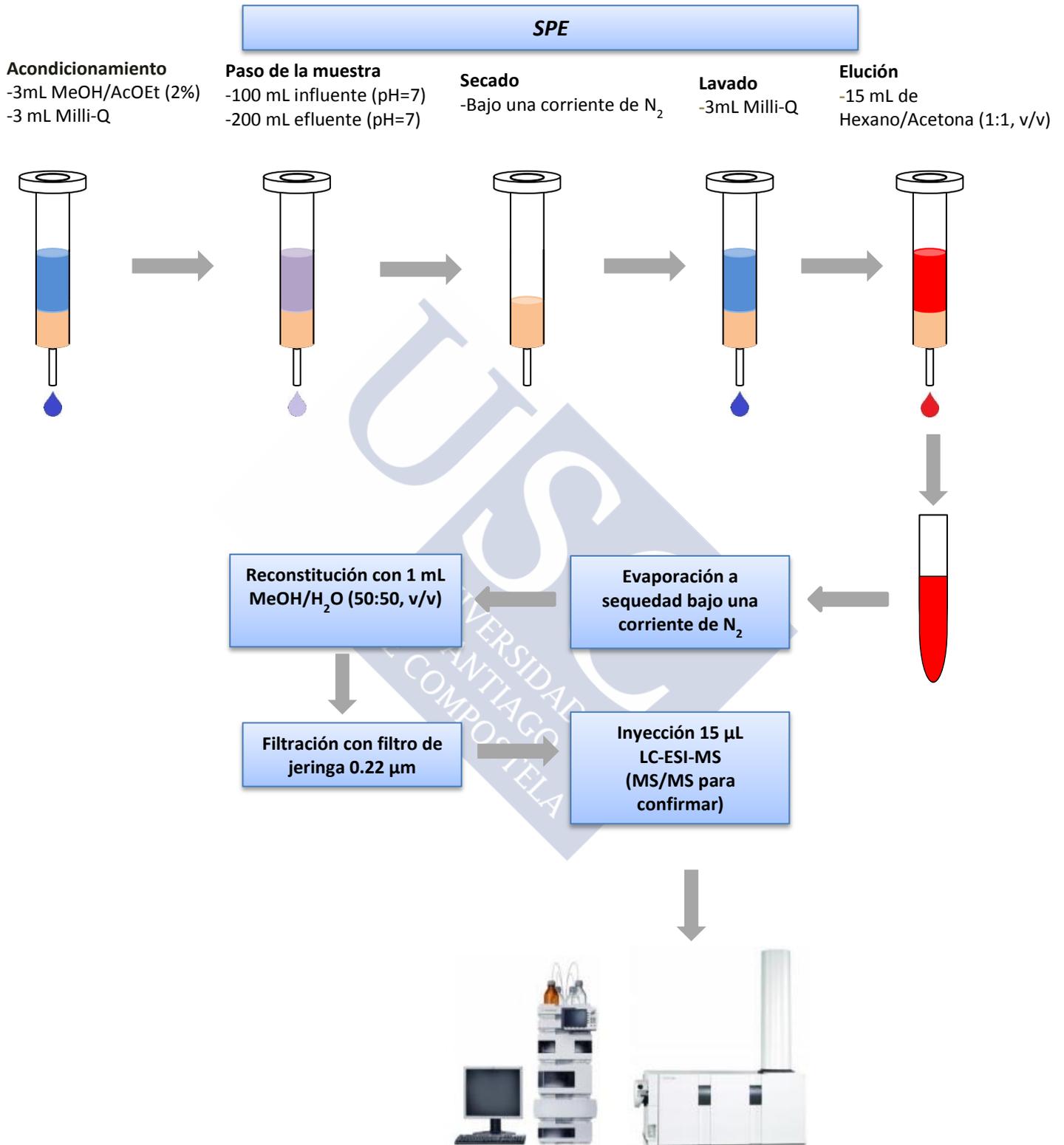
B.CONTAMINANTES EMERGENTES: COXIBs

Una de las principales novedades aportadas en esta Tesis es el desarrollo de una metodología analítica para la determinación de esta familia de fármacos, ya que hasta la fecha no se encuentra descrita ninguna para el análisis de muestras medioambientales, y sólomente algunos de ellos han sido incluidos en estudios médicos realizando ensayos in vivo en animales siendo las muestras en todo caso de carácter biológico, a excepción de alguno cuyo análisis fue realizado en matrices de leche. El interés que puede suscitar dicho estudio se debe en gran medida al aumento del consumo que han experimentado este tipo de NSAIDs en los últimos años, como alternativa menos agresiva a los NSAIDs tradicionales. Resulta pues, un punto de partida interesante el aplicar nuevas metodologías para su determinación ya que es de esperar que su presencia en el medioambiente sea relevante.

En primer lugar se decidió aplicar como técnica de extracción la SPE (**Figura III.2**) a muestras acuosas, realizando la optimización del método sobre aguas residuales recogidas en una estación depuradora, tanto de entrada (influyente) como de salida (efluente) de la misma y su aplicación posterior a dichas aguas así como a aguas superficiales. La determinación de 6 COXIBs se llevó a cabo mediante LC-ESI-QTOF-MS. Durante la etapa de optimización se probaron diferentes cartuchos poliméricos, siendo los Oasis MAX (modo mixto, de fase reversa e intercambiador aniónico fuerte) los que condujeron a mejores resultados. Además se tuvieron en cuenta otros factores importantes como el pH o la fuerza iónica.

En este trabajo, además de alcanzar unos LOQs más que aceptables, se detectó la presencia de dos analitos (etoricoxib y celecoxib) tanto en las muestras procedentes de la entrada como de la salida de la estación depuradora. Asimismo, también se encontraron dos metabolitos de dichos compuestos (celecoxib carboxílico y etoricoxib hidroxilado).

Figura III.2. Esquema representativo de la metodología empleada para la determinación de los COXIBs empleando la SPE.



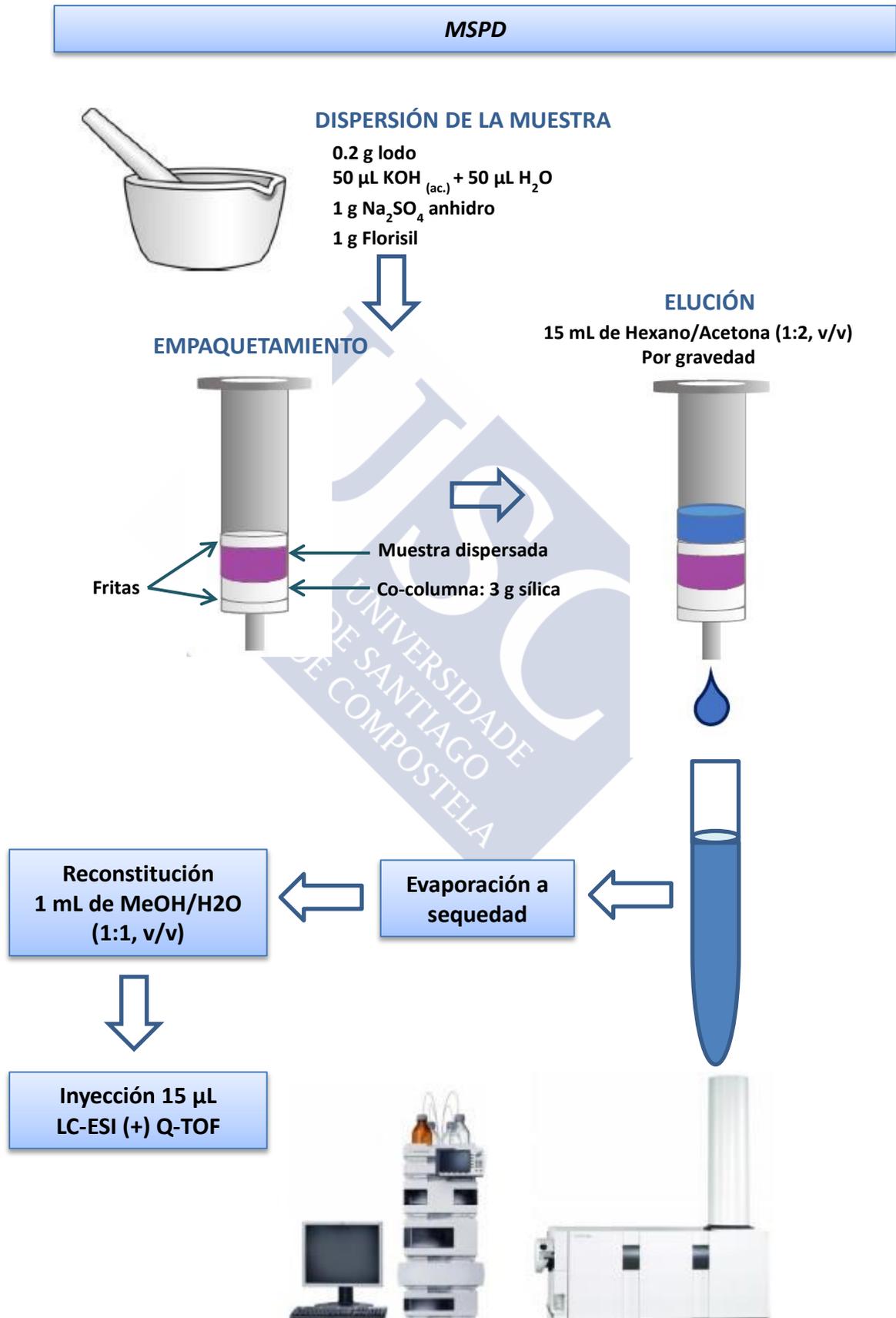
Como ya se ha mencionado, la propuesta de metodologías analíticas para el tratamiento de los COXIBs en muestras ambientales es escasa o nula y, en cuanto a matrices sólidas como el caso concreto de lodos (tratados y crudos); es también un campo de estudio abierto y todavía inexplorado.

La técnica seleccionada para el tratamiento de muestras sólidas propuesto en esta Tesis es la MSPD, ya que con respecto a otras técnicas como puede ser la extracción con Soxhlet, se obtienen buenos rendimientos, en un tiempo experimental menor, con un bajo impacto ambiental y menores costes debido a su consumo reducido de disolventes orgánicos.

En este sentido, el tercer trabajo propone un método sencillo y robusto en el que se determinaron 5 COXIBs (valdecoxib, etoricoxib, parecoxib, celecoxib y 2,5-dimetilcelecoxib) en lodos empleando la MSPD como técnica de preparación de muestra. Se evaluaron los parámetros que afectan al proceso de extracción, así como los efectos de matriz, observando que no era preciso hacer ningún tipo de corrección con patrón interno y por lo tanto haciendo del método un proceso rápido y simple.

Como técnica de separación y detección se utilizó la cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas provisto de un analizador híbrido cuadrupolo-tiempo de vuelo. Los LOQs encontrados fueron muy satisfactorios con valores comprendidos entre 0.005 y 0.05 ng g⁻¹.

Figura III.3. Esquema representativo de la metodología empleada para la determinación de los COXIBs empleando la MSPD.



METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS

En esta sección se incluyen las siguientes publicaciones:

Publicación III.2

“SELECTIVE DETERMINATION OF COXIBs IN ENVIRONMENTAL WATER SAMPLES BY MIXED-MODE SOLID PHASE EXTRACTION AND LIQUID CHROMATOGRAPHY QUADRUPOLE TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRY”

Sara Triñanes, M^a Carmen Casais, M^a Carmen Mejuto, Rafael Cela

Journal of Chromatography A 1420 (2015) 35-45

Enlace: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2015.10.004>





Publicación III.3

“MATRIX SOLID-PHASE DISPERSION FOLLOWED BY LIQUID CHROMATOGRAPHY
TANDEM MASS SPECTROMETRY FOR THE DETERMINATION OF SELECTIVE
CYCLOOXYGENASE-2 INHIBITORS IN SEWAGE SLUDGE SAMPLES”

Sara Triñanes, M^a Carmen Casais, M^a Carmen Mejuto, Rafael Cela

Journal of Chromatography A 1462 (2016) 35-43

Enlace: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.07.044>







IV. CONCLUSIONES GENERALES



A lo largo del apartado anterior se han descrito de manera minuciosa las conclusiones derivadas de cada trabajo en el correspondiente artículo científico. Por lo tanto, en esta sección se recogen de manera resumida las conclusiones globales obtenidas teniendo en cuenta que en esta Tesis Doctoral se han abordado dos grupos de familias diferentes y por lo tanto serán analizadas por separado.

A. HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

La metodología desarrollada para la determinación de estos compuestos ha consistido en aplicar un método de extracción mediante ab/adsorción sobre ab/adsorbentes sólidos empleando como método de análisis UPLC-FD-UV. Se puede afirmar que este trabajo presenta buenos resultados en cuanto a linealidad ($=0.9991$) y límites de cuantificación ($0.7\text{-}2.3\ \mu\text{g L}^{-1}$ para UV y $0.16\text{-}3.90\ \text{ng L}^{-1}$ para FL), logrando una separación cromatográfica de los 24 analitos con una resolución aceptable.

Tras una revisión bibliográfica de técnicas empleadas para la determinación de estos compuestos, se ha comprobado que técnicas como la extracción sorptiva Kevlar o la SPME proporcionan unos LOQs mucho más deficientes que la propuesta. En cuanto a la SBSE se observó que no existen diferencias significativas en los resultados, aunque la desarrollada en este estudio tiene la ventaja de que el ab/adsorbente presenta un coste muy reducido en comparación con los Twisters o las fibras de SPME. Esto también deriva en una mejor solución en cuanto a problemas de contaminación cruzada, ya que pueden ser desechadas tras su uso y su formato se puede adecuar al tipo de análisis teniendo la oportunidad de disponer del volumen necesario dependiendo de la aplicación.

Puesto que los PAHs son poco polares, éstos tienden a adsorberse a las paredes de los recipientes de vidrio planteando dificultades a la hora de realizar la extracción en matrices acuosas, produciéndose pérdidas importantes de los analitos. La adición de una pequeña cantidad de disolvente orgánico solucionó, en gran medida, este problema.

Otra característica importante con respecto al proceso de extracción es que queda reflejada la importancia de muestrear en espacio de cabeza que consigue

mejorar la selectividad de la extracción. En inmersión directa los PAHs más pesados manifiestan buenas recuperaciones, pero los más volátiles se pierden y muestreando en ambos modos se obtienen buenos resultados.

B. INHIBIDORES SELECTIVOS DE LA CICLOOXIGENASA-2: COXIBs

Por primera vez se ha desarrollado una metodología analítica para la determinación de COXIBs en matrices ambientales (aguas residuales y lodos) sin que la señal de los compuestos se vea comprometida de manera significativa debido a posibles efectos de matriz, especialmente durante la etapa de ionización de los analitos en la interfase de electrospray. Se emplearon dos técnicas de extracción, una para cada tipo de muestra: la extracción en fase sólida (SPE) ha sido la seleccionada para las aguas residuales y la dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) para los lodos.

El análisis de COXIBs en aguas residuales (influyente y efluente) mediante SPE ha demostrado ser una técnica efectiva, robusta y lo suficientemente sensible para lograr unos límites de cuantificación muy aceptables. El uso de adsorbentes de modo mixto (cartuchos Oasis MAX) permitió obtener extractos libres de interferencias y observar así eficacias de ionización por electrospray constantes en patrones y muestras de lo que se colige una ausencia de efecto matriz.

Para la determinación de COXIBs en lodos se ha optimizado un método de MSPD en un único paso combinando extracción y *clean-up* en la misma etapa. La eficacia de extracción mejoró considerablemente gracias a la adición de un pequeño volumen de disolución alcalina obteniendo extractos suficientemente limpios pudiendo analizarlos sin posteriores etapas de purificación adicional.

Se ha ratificado la capacidad de los sistemas híbridos Q-TOF para identificar compuestos no considerados a priori en el método. Ha sido posible detectar en muestras reales metabolitos derivados del celecoxib y el etoricoxib, así como otros fármacos entre los que se encuentran un par de antimicóticos, un agente antiarrítmico y su correspondiente derivado metabólico y un NSAID.







SIGLAS Y ACRÓNIMOS



A		
ACN	Acetonitrile	Acetonitrilo
AcOEt	Ethyl acetate	Acetato de etilo
AOPs	Advanced oxidation processes	Procesos de oxidación avanzada
APCI	Atmospheric-pressure chemical ionization	Ionización química a presión atmosférica
APPI	Atmospheric-pressure photoionization	Fotoionización a presión atmosférica
C		
C ₈	Octylsilane	Octilsilano
C ₁₈	Octadecylsilane	Octadecilsilano
CF-SBSE	Continuous-flow stir-bar sorptive extraction	Extracción mediante absorción sobre barras agitadoras de flujo continuo
COX	Cicloxygenase	Ciclooxigenasa
CS	Cardiovascular safety	Seguridad cardiovascular
CTPVs	Coal tar pitch volatiles	Productos volátiles del residuo de alquitrán
D		
DDD	Daily-defined dose	Dosis diarias definidas
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft	Fundación alemana de investigación
DMSO	Dimethyl sulfoxide	Dimetilsulfóxido
DOM	Dissolved organic matter	Materia orgánica disuelta
E		
EF	Emission factor	Factor de emisión
EFSA	European food safety authority	Autoridad europea de seguridad alimentaria
EPA	Environmental protection agency	Agencia de protección medioambiental
ESI	Electrospray source ionization	Fuente de ionización por electroespray
F		
FDA	United States food and drug administration	Agencia de medicamentos y alimentos de los Estados Unidos
FL	Fluorescence	Fluorescencia
G		
G-PCRs	G-protein coupled receptors	Receptores acoplados a la proteína

H		
HLB	Hydrophilic-lipophilic balance	Balance hidrofílico-lipofílico
HPLC	High performance liquid chromatography	Cromatografía de líquidos de alta eficacia
HSSE	Headspace sorptive extraction	Extracción mediante absorción en espacio de cabeza
I		
IARC	International agency for research on cancer	Agencia internacional para la investigación del cáncer
IMs	Immunsorbent	Inmunoabsorbente
IUPAC	International Union of pure and applied chemistry	Unión internacional de química pura aplicada
K		
K _{ow}	Octanol-water partition constant	Constante de partición octanol-agua
L		
LC	Liquid chromatography	Cromatografía de líquidos
LLE	Liquid-liquid extraction	Extracción líquido-líquido
LOD	Limit of detection	Límite de detección
LOQ	Limit of quantification	Límite de cuantificación
LRC	Large reservoir cartridge	Cartucho de gran depósito
M		
MAE	Microwaved assisted extraction	Extracción asistida por microondas
MAX	Mixed-mode anionic exchange	Intercambiador aniónico de modo mixto
MCX	Mixed-mode cation exchange	Intercambiador catiónico de modo mixto
ME	Matrix effects	Efectos de matriz
MeOH	Methanol	Metanol
MIPs	Molecularly imprinted polymer	Polímero impreso molecularmente
MRM	Multiple reaction monitoring	Monitorización de iones múltiple
MS	Mass spectrometry	Espectrometría de masas
MSPD	Matrix solid-phase dispersion	Dispersión de la matriz en fase sólida
MS/MS	Tandem mass spectrometry	Espectrometría de masas en tándem
MW	Molecular weight	Peso molecular
m/z	Mass/charge ratio	Relación masa/carga
N		
NIOSH	National Institute for occupational safety and health	Instituto nacional para la seguridad y salud ocupacional

N-PAH	Nitro polycyclic aromatic hydrocarbon	Nitro hidrocarburo aromático policíclico
NSAID	Non-steroidal antiinflammatory drug	Antiinflamatorio no esteroideo
P		
PAH	Polycyclic aromatic hydrocarbon	Hidrocarburo aromático policíclico
PDMS	Polydimethylsiloxane	Polidimetilsiloxano
PEL	Permissible exposure limits	Límites de exposición permitidos
PGs	Prostaglandines	Prostaglandinas
PLE	Pressurized liquid extraction	Extracción con líquidos presurizados
POPs	Persistent organic pollutants	Contaminantes orgánicos persistentes
PSA	Amino-propyl silica	Sílice aminopropílica
PU	Polyurethane	Poliuretano
Pv	Vapour pressure	Presión de vapor
PVP-DVB	Poly(N-vinylpyrrolidone) Divinylbenzene	Poli(N-divinilpirrolidona) Divinilbenceno
Q		
Q	Quadrupole	Cuadrupolo
QqQ	Triple quadrupole	Triple cuadrupolo
QTOF	Quadrupole time-of-flight	Cuadrupolo tiempo de voo
R		
R	Recovery	Recuperación
RAMs	Restricted-access materials	Adsorbentes de acceso restringido
REL	Recommended exposure limits	Límites de exposición recomendados
RSD	Relative standard deviation	Desviación estándar relativa
S		
SAX	Strong anion exchange	Intercambiador aniónico fuerte
SBSE	Stir bar sorptive extraction	Extracción mediante absorción sobre barras agitadoras
SCX	Strong cation exchange	Intercambiador catiónico fuerte
SFE	Supercritical fluids extraction	Extracción con fluidos supercríticos
SIM	Selected ion monitoring	Monitorización del ión seleccionado
SLE	Supported liquid extraction	Extracción líquida en soporte
S/N	Signal/noise ratio	Relación señal/ruido
SPE	Solid phase extraction	Extracción en fase sólida
SPE-PT	Solid phase extraction-pipette tips	Extracción en fase sólida en puntas de pipeta
SPME	Solid phase microextraction	Microextracción en fase sólida
St-DVB	Styrene divinylbenzene	Estireno divinilbenceno

T

TLV	Threshold limit value	Valor umbral límite
t-NSAID	Traditional non-steroidal antiinflammatory drug	Antiinflamatorio tradicional no esteroideo
TOF	Time-of-flight	Tiempo de vuelo
TWA	Time weighted average	Promedio ponderado en el tiempo

U

UGTs	Uridine-5-diphospho-glucuronosyltransferase	Uridina-5-difosfoglucuronosiltransferase
UPLC	Ultra-Performance liquid chromatography	Cromatografía de líquidos de ultra eficacia
USE	Ultrasound-assisted solvent extraction	Extracción con disolventes asistida por ultrasonidos
UV-vis	Ultraviolet-visible	Ultravioleta-visible

W

WAX	Weak anionic exchange	Intercambiador aniónico débil
WCX	Weak cationic exchange	Intercambiador catiónico débil
WFD	Water framework directive	Directiva marco de aguas
WHO	World health organization	Organización mundial de la salud
WWTP	Wastewater treatment plant	Planta de tratamiento de aguas

