



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 ENFOCADAS A ESTUDIOS DE DETERMINACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE CONTAMINANTES EMERGENTES AZÓLICOS EN EL MEDIO AMBIENTE

Jorge Casado Agrelo

Memoria para optar al grado de Doctor en Química

SANTIAGO DE COMPOSTELA

Septiembre 2015



D. Isaac Rodríguez Pereiro, Profesor Titular de Universidad del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela

D. Rafael Cela Torrijos, Catedrático de Universidad del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela

Dña. María Ramil Criado, Profesora Contratada Doctor del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela

Como directores de la Tesis Doctoral titulada «**Nuevas estrategias analíticas enfocadas a estudios de determinación y distribución de contaminantes emergentes azólicos en el medio ambiente**» presentada por **D. Jorge Casado Agrelo**, alumno 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 Directores de la misma no incurrir en las causas de abstención establecidas en la Ley 30/1992.

Santiago de Compostela, a 14 de septiembre de 2015

Fdo: Isaac Rodríguez Pereiro

Fdo: Rafael Cela Torrijos

Fdo: María Ramil Criado



D. Isaac Rodríguez Pereiro, D. Rafael Cela Torrijos y Dña. María Ramil Criado, como directores de la Tesis titulada «**Nuevas estrategias analíticas enfocadas a estudios de determinación y distribución de contaminantes emergentes azóxicos en el medio ambiente**»,

Por la presente DECLARAN:

Que la Tesis presentada por **D. Jorge Casado Agrelo** 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 14 de septiembre de 2015

Fdo: Isaac Rodríguez Pereiro

Fdo: Rafael Cela Torrijos

Fdo: María Ramil Criado



RESUMEN

Palabras clave: Cromatografía de gases, Cromatografía de líquidos, Espectrometría de masas, Benzotriazoles, Fármacos antimicóticos

En esta Tesis Doctoral se describe el desarrollo y la aplicación de nuevas estrategias de análisis útiles para la determinación de contaminantes emergentes azólicos en muestras medioambientales. Concretamente, las familias estudiadas son los benzotriazoles inhibidores de procesos de corrosión, los estabilizadores UV benzotriazólicos (Tinuvin), y los fármacos antimicóticos. Los métodos de análisis desarrollados consisten en una primera etapa de preparación de muestra mediante SPE, SPME o DLLME, para muestras líquidas, y MSPD, para muestras sólidas; seguida de una segunda etapa de determinación de las sustancias mediante LC-MS/MS o GC-MS/MS con analizador de masas híbrido cuadrupolo-tiempo de vuelo (QTOF) de última generación.

Los métodos analíticos aquí desarrollados han sido utilizados para llevar a cabo estudios medioambientales en los que se han analizado muestras de agua tomadas en ríos de España que soportan vertidos de estaciones depuradoras de aguas residuales, así como en la entrada y la salida de estas plantas, con el objetivo de estimar los coeficientes de eliminación alcanzados en los procesos de tratamiento de aguas residuales. Paralelamente, estas sustancias han sido determinadas en muestras de lodos generados durante estos tratamientos para confirmar o descartar la ocurrencia de procesos de adhesión y sedimentación de estos contaminantes emergentes en la materia particulada.

Finalmente, se han llevado a cabo estudios de estabilidad de algunos de los contaminantes emergentes estudiados bajo los efectos de la luz UV. La aplicación de este tipo de radiación como tratamiento terciario en algunas estaciones depuradoras de aguas residuales hace interesante conocer si su eficacia es tal, que consigue mineralizar completamente los compuestos presentes en el agua, o si da lugar a nuevas sustancias que pudieran ser más peligrosas que los compuestos de partida. Además, dado que una fracción de la luz del Sol es radiación UV, es interesante estudiar las reacciones que pueden desencadenarse sobre los terrenos agrícolas abonados con lodos procedentes de estas plantas.

ABSTRACT

Keywords: Gas chromatography, Liquid chromatography, Mass spectrometry, Benzotriazoles, Antimycotic drugs

In this PhD dissertation, the development and the application of new analytical strategies useful for the determination of azolic emerging contaminants in environmental samples are described. The studied families are the benzotriazole corrosion inhibitors, the benzotriazole UV stabilizers (Tinuvin) and the antimycotic pharmaceuticals. The developed analytical methods consist of a sample preparation stage by SPE, SPME or DLLME, for liquid samples, and MSPD, for solid samples, followed by analytes determination by LC-MS/MS or GC-MS/MS with the state-of-the-art quadrupole-time of flight (QTOF) mass analyzers.

The developed analytical methods have been used in environmental studies involving the analysis of water samples, taken at Spanish rivers receiving discharges from sewage treatment plants, as well as at the entrance and the way out of these plants, with the aim of assessing the elimination coefficients reached in the wastewater treatment. In addition, these substances have been determined in sewage sludge, generated during these treatments, in order to confirm or refute the existence of sorption and sedimentation processes of them with the particulate matter.

Finally, stability studies have been undertaken aiming to determine the degradability of some of these emerging contaminants exposed to UV light. The application of this kind of radiation as tertiary process in some sewage treatment plants makes it interesting to know whether total mineralization of the pollutants is possible or if new substances appear, which may be even more dangerous than the precursor compounds. Besides, given that a fraction of the sunlight is UV radiation, it is also concerning to study the reactions that could be favoured on agricultural fields amended with sludge from sewage treatment plants.

AGRADECIMIENTOS

Agradecer el aporte de financiación a la Investigación por parte del Ministerio de Economía y Competitividad (UE-FEDER, proyecto CTQ2012-33080) y la Xunta de Galicia (UE-FEDER, proyecto EM14/004), así como la Beca para la Ampliación de Estudios Universitarios en el Extranjero 2014 otorgada por la Fundación Barrié.

A los directores de esta Tesis Doctoral, el Profesor Titular de Universidad Isaac Rodríguez, el Catedrático de Universidad Rafael Cela, y la Profesora Contratada Doctor María Ramil, del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidade de Santiago de Compostela, a la responsable de la estancia de investigación en la University of South Carolina, Full Professor Susan D. Richardson, y al resto de compañeros y miembros del Grupo de Investigación de Cromatografía y Quimiometría: M^a Herminia Bollaín, M^a Carmen Casais, M^a Carmen Mejuto, J. Benito Quintana, Rosario Rodil, Elisa Rubí, Josu Aguirre, Inmaculada Carpinteiro, Gabriela Castro, Iria González Mariño, Rosa Montes, Riccardo Nescatelli, Edgar Y. Ordóñez, Inés Racamonde, Tania Rodríguez Álvarez, Tamara Rodríguez Cabo, Benigno J. Sieira, Sara Triñanes y Eugenia Villaverde de Saa.

Al Instituto de Investigación y Análisis Alimentario, a la Facultad de Química, al Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela, al Graduate Science Research Center y al Department of Chemistry and Biochemistry de la University of South Carolina.



«Investigar es ver lo que otros ven y pensar lo que nadie ha pensado»

Hans A. Krebs





ÍNDICE



ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	ABBREVIATIONS AND ACRONYMS	1
SUMMARY		9
1. AIMS		11
2. INTRODUCTION		12
3. RESEARCH ACTIVITIES AND RESULTS		15
4. REFERENCES		21
I. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS		25
II. INTRODUCCIÓN		29
II. A. SUSTANCIAS QUÍMICAS ESTUDIADAS		31
1. CONTAMINANTES EMERGENTES EN EL MEDIO AMBIENTE		33
2. BENZOTRIAZOLES		36
2.1. DEFINICIÓN Y USOS		36
2.2. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS		36
2.3. TOXICIDAD Y DISTRIBUCIÓN EN EL MEDIO AMBIENTE		39
3. ESTABILIZADORES ULTRAVIOLETA BENZOTRIAZÓLICOS		42
3.1. DEFINICIÓN Y USOS		42
3.2. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS		42
3.3. TOXICIDAD Y DISTRIBUCIÓN EN EL MEDIO AMBIENTE		46
4. FÁRMACOS ANTIMICÓTICOS		50
4.1. DEFINICIÓN Y USOS		50
4.2. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS		50
4.3. TOXICIDAD Y DISTRIBUCIÓN EN EL MEDIO AMBIENTE		53
5. BIBLIOGRAFÍA		57

II. B. PREPARACIÓN DE MUESTRA	65
1. MUESTRAS LÍQUIDAS	68
1.1. EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO	68
1.2. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA	69
1.2.1. Etapas	70
1.2.2. Materiales adsorbentes	71
1.2.3. Aplicaciones de SPE a la extracción de benzotriazoles en muestras de agua	74
1.2.4. Aplicaciones de SPE a la extracción de fármacos antimicóticos en muestras de agua	75
1.3. TÉCNICAS DE MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA	77
1.3.1. Etapas	77
1.3.2. Dispositivos	78
1.3.3. Aplicaciones de SPME a la extracción de benzotriazoles en muestras de agua	80
1.4. TÉCNICAS DE MICROEXTRACCIÓN EN FASE LÍQUIDA	81
1.4.1. Microextracción con gota suspendida	81
1.4.2. Microextracción líquido-líquido dispersiva	82
1.4.3. Aplicaciones de LPME a la extracción de benzotriazoles en muestras de agua	83
2. MUESTRAS SÓLIDAS	84
2.1. EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO	84
2.1.1. Aplicaciones de SLE a la extracción de BUVSs en muestras de lodo	85
2.1.2. Aplicaciones de SLE a la extracción de fármacos antimicóticos en muestras de lodo	85
2.2. TÉCNICAS INSTRUMENTALES DE EXTRACCIÓN	86
2.2.1. Extracción con líquidos presurizados	87
2.2.2. Extracción asistida por microondas	88
2.2.3. Extracción con fluidos supercríticos	89
2.3. DISPERSIÓN DE MATRIZ EN FASE SÓLIDA	89
2.3.1. Etapas	90
2.3.2. Materiales dispersantes	91

2.3.3.	Procedimientos de <i>clean-up</i>	92
2.3.4.	Aplicaciones de MSPD a la extracción de BUVSs en muestras medioambientales.....	93
3.	BIBLIOGRAFÍA.....	94
II. C.	ANÁLISIS	99
1.	ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	103
1.1.	ANALIZADOR.....	103
1.1.1.	Cuadrupolo.....	103
1.1.2.	Trampa de iones.....	104
1.1.3.	Analizador de tiempo de vuelo.....	104
1.2.	PARÁMETROS DE CALIDAD.....	105
1.2.1.	Ciclo de trabajo.....	106
1.2.2.	Sensibilidad.....	106
1.2.3.	Resolución.....	106
1.2.4.	Exactitud de masas.....	107
1.3.	ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM.....	107
1.3.1.	Triple cuadrupolo.....	108
1.3.2.	Cuadrupolo-tiempo de vuelo.....	109
2.	CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	111
2.1.	INYECCIÓN.....	112
2.2.	IONIZACIÓN.....	113
2.2.1.	Ionización electrónica.....	114
2.2.2.	Ionización química.....	114
2.3.	APLICACIONES DE GC-MS A LA DETERMINACIÓN DE LAS SUSTANCIAS ESTUDIADAS.....	115
3.	CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS-ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	116
3.1.	INYECCIÓN.....	118
3.2.	IONIZACIÓN.....	118
3.2.1.	Ionización por electrospray.....	118
3.2.2.	Ionización química a presión atmosférica.....	119

3.2.3. Fotoionización a presión atmosférica.....	119
3.3. APLICACIONES DE LC-MS A LA DETERMINACIÓN DE LAS SUSTANCIAS ESTUDIADAS.....	120
4. BIBLIOGRAFÍA.....	122
III. RESULTS AND DISCUSSION	125
III. A. BENZOTRIAZOLES.....	129
ARTICLE III.A.1: Determination of benzotriazoles in water samples by concurrent derivatization-dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry.....	133
ARTICLE III.A.2: Polyethersulfone solid-phase microextraction followed by liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry for benzotriazoles determination in water samples.....	165
ARTICLE III.A.3: Gas chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry determination of benzotriazole ultraviolet stabilizers in sludge samples.....	193
III. B. ANTIMYCOTIC DRUGS	217
ARTICLE III.B.1: Selective determination of antimycotic drugs in environmental water samples by mixed-mode solid-phase extraction and liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry.....	221
ARTICLE III.B.2: Selective extraction of antimycotic drugs from sludge samples using matrix solid-phase dispersion followed by on-line clean-up.....	245
ARTICLE III.B.3: Identification of antimycotic drugs transformation products upon UV exposure.....	275
IV. CONCLUSIONS	301
APPENDIX I: PUBLISHED ARTICLES.....	309
APPENDIX II: OTHER PUBLISHED ARTICLES.....	371

ABREVIATURAS Y
ACRÓNIMOS
*ABBREVIATIONS AND
ACRONYMS*



4-TTri	4-metil-1H-benzotriazol	<i>4-methyl-1H-benzotriazole</i>
5-CIBTri	5-cloro-1H-benzotriazol	<i>5-chloro-1H-benzotriazole</i>
5-TTri	5-metil-1H-benzotriazol	<i>5-methyl-1H-benzotriazole</i>
A		
Abv	Abreviatura	<i>Abbreviation</i>
ACN	Acetonitrilo	<i>Acetonitrile</i>
AcOEt	Acetato de etilo	<i>Ethyl acetate</i>
Acond	Acondicionamiento	<i>Conditioning</i>
ADF	Fluido descongelante para aviación	<i>Aircraft deicing fluid</i>
aka	también conocido como	<i>also known as</i>
AMI	Amiodarona	<i>Amiodarone</i>
AMT	Amitriptilina	<i>Amitriptyline</i>
APCI	Ionización química a presión atmosférica	<i>Atmospheric pressure chemical ionization</i>
API	Ionización a presión atmosférica	<i>Atmospheric pressure ionization</i>
APPI	Fotoionización a presión atmosférica	<i>Atmospheric pressure photoionization</i>
ASE	Extractor con disolventes acelerados	<i>Accelerated solvent extractor</i>
B		
B.S.	Lodo biológico	<i>Biological sludge</i>
BSTFA	N,O-Bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida	<i>N,O-Bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide</i>
BTri	1H-benzotriazol	<i>1H-benzotriazole</i>
BUVS	Estabilizador ultravioleta benzotriazólico	<i>Benzotriazole ultraviolet stabilizer</i>
C		
C18	Octadecilsilano	<i>Octadecylsilane</i>
C8	Octilsilano	<i>Octylsilane</i>
ca.	aproximadamente	<i>approximately</i>
CAR	Carboxeno	<i>Carboxene</i>
CAS	Chemical Abstracts Service (USA)	<i>Chemical Abstracts Service (U.S.)</i>
CBA	(Carboxi) metilsilano	<i>(Carboxy) methylsilane</i>
CBZ	Climbazol	<i>Climbazole</i>
CI	Ionización química	<i>Chemical ionization</i>
CID	Fragmentación inducida por colisión	<i>Collision-induced dissociation</i>
Conc	Concentración	<i>Concentration</i>
CTZ	Clotrimazol	<i>Clotrimazole</i>
D		
DBA	(Dietilamino) propilsilano	<i>(Diethylamino) propylsilane</i>
DBE	Doble enlace equivalente	<i>Double bond equivalent</i>
DLLME	Microextracción líquido-líquido dispersiva	<i>Dispersive liquid-liquid microextraction</i>
E		
e.g.	por ejemplo	<i>for example</i>
EC	Contaminante emergente	<i>Emerging contaminant</i>
ECZ	Econazol	<i>Econazole</i>

EE	Eficacia de extracción	<i>Extraction efficiency</i>
EF	Factor de enriquecimiento	<i>Enrichment factor</i>
EHMC	2-etilhexil 4-metoxicinamato	<i>2-ethylhexyl 4-methoxycinnamate</i>
EI	Ionización electrónica	<i>Electronic ionization</i>
EIC	Cromatograma de iones extraídos	<i>Extracted ion chromatogram</i>
EPA	Agencia de Protección Ambiental (USA)	<i>Environmental Protection Agency (U.S.)</i>
ESI	Ionización por electrospray	<i>Electrospray ionization</i>
et al.	y otros	<i>and others</i>
ETZ	Etaconazol	<i>Etaconazole</i>
F		
FCZ	Fluconazol	<i>Fluconazole</i>
FPSE	Extracción con polímeros modificados químicamente	<i>Fabric-phase sorptive extraction</i>
FWHM	Anchura a media altura	<i>Full width at half maximum</i>
G		
GC	Cromatografía de gases	<i>Gas chromatography</i>
H		
HF-LPME	Microextracción en fase líquida con fibra hueca	<i>Hollow fiber liquid-phase microextraction</i>
HILIC	Cromatografía de interacción hidrofílica	<i>Hydrophilic interaction chromatography</i>
HLB	Balace hidrofílico lipofílico	<i>Hydrophilic lipophilic balance</i>
HPV	Sustancias químicas producidas en grandes volúmenes	<i>High production volume chemicals</i>
HR	Alta resolución	<i>High resolution</i>
I		
i.d.	Diámetro interno	<i>Internal diameter</i>
i.e.	esto es	<i>that is</i>
IS	Patrón interno	<i>Internal surrogate</i>
IT	Trampas de iones	<i>Ion trap</i>
K		
K _{ow}	Constante de distribución octanol/agua	<i>Octanol/water partition constant</i>
KTZ	Ketoconazol	<i>Ketoconazole</i>
L		
LC	Cromatografía de líquidos	<i>Liquid chromatography</i>
LC ₅₀	Concentración letal media	<i>Median lethal concentration</i>
LLE	Extracción líquido-líquido	<i>Liquid-liquid extraction</i>
LOQ	Límite de cuantificación	<i>Limit of quantification</i>
LPME	Microextracción en fase líquida	<i>Liquid-phase microextraction</i>
M		
m/z	Relación masa/carga	<i>Mass-to-charge ratio</i>
MAE	Extracción asistida por microondas	<i>Microwave assisted extraction</i>

MASE	Extracción con disolventes asistida por membrana	<i>Membrane assisted solvent extraction</i>
MAX	Intercambio aniónico en modo mixto	<i>Mixed-mode anion exchange</i>
MCX	Intercambio catiónico en modo mixto	<i>Mixed-mode cation exchange</i>
MCZ	Miconazol	<i>Miconazole</i>
ME	Efecto matriz	<i>Matrix effect</i>
MeOH	Metanol	<i>Methanol</i>
MIP	Polímero impreso molecularmente	<i>Molecular imprinted polymer</i>
MS	Espectrometría de masas	<i>Mass spectrometry</i>
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem	<i>Tandem mass spectrometry</i>
MSPD	Dispersión de matriz en fase sólida	<i>Matrix solid-phase dispersion</i>
MSTFA	N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida	<i>N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide</i>
MTBSTFA	N-metil-N-(tert-butildimetilsilil) trifluoroacetamida	<i>N-Methyl-N-(tert-butyl dimethylsilyl) trifluoroacetamide</i>
N		
NIST	Instituto Nacional de Patrones y Tecnología (USA)	<i>National Institute of Standards and Technology (U.S.)</i>
P		
P.S.	Lodo primario	<i>Primary sludge</i>
PA	Poliacrilato	<i>Polyacrylate</i>
PAH	Hidrocarburo aromático policíclico	<i>Polycyclic aromatic hydrocarbon</i>
PBDE	(Polibromo) difeniléter	<i>Polybrominated diphenylether</i>
PDMS	Polidimetilsiloxano	<i>Polydimethylsiloxane</i>
PEG	Polietilenglicol	<i>Polyethylene glycol</i>
PES	Poliétersulfona	<i>Polyethersulphone</i>
PET	Tereftalato de polietileno	<i>Polyethylene terephthalate</i>
PFTBA	Perfluoro tributilamina	<i>Perfluoro tributylamine</i>
PFOS	Ácido prefluoro octanosulfónico	<i>Perfluoro octanesulfonic acid</i>
PLE	Extracción con líquidos presurizados	<i>Pressurized liquid extraction</i>
PP	Polipropileno	<i>Polypropylene</i>
ppm	Partes por millón	<i>Parts per million</i>
PRS	(Sulfonil) propilsilano	<i>(Sulfonyl) propylsilane</i>
PS	Poliestireno	<i>Polystyrene</i>
PSA	Aminas primarias y secundarias enlazadas a sílice	<i>Primary secondary amines bound to silica</i>
PTFE	Politetrafluoroetileno, Teflón	<i>Polytetrafluoroethylene, Teflon</i>
PTV	Inyector de temperatura programable	<i>Programmed temperature vaporizer</i>
Q		
Q	Cuadrupolo	<i>Quadrupole</i>
QqQ	Triple cuadrupolo	<i>Triple quadrupole</i>
QSAR	Relación cuantitativa estructura actividad	<i>Quantitative structure activity relationships</i>
QTOF	Cuadrupolo-tiempo de vuelo	<i>Quadrupole time-of-flight</i>
QuEChERS	Rápido, fácil, económico, eficaz, sólido y seguro	<i>Quick, easy, cheap, effective, rugged and safe</i>

R

R	Recuperación global	<i>Overall recovery</i>
R ²	Coefficiente de determinación	<i>Determination coefficient</i>
RAM	Material de acceso restringido	<i>Restricted access material</i>
Ref	Referencia	<i>Reference</i>
RM	Material de referencia	<i>Reference material</i>
Rs	Factor de resolución	<i>Resolution factor</i>
RSD	Desviación estándar relativa	<i>Relative standard deviation</i>

S

S/N	Relación señal/ruido	<i>Signal-to-noise ratio</i>
SAX	Intercambio aniónico fuerte	<i>Strong anion exchange</i>
SBSE	Extracción por adsorción con barra agitadora	<i>Stir-bar sorptive extraction</i>
SCX	Intercambio catiónico fuerte	<i>Strong cation exchange</i>
SD	Desviación estándar	<i>Standard deviation</i>
SDME	Microextracción con gota suspendida	<i>Single-drop microextraction</i>
SDWA	Acta de Seguridad del Agua Potable	<i>Safe Drinking Water Act</i>
SER	Sertralina	<i>Sertraline</i>
SFE	Extracción con fluidos supercríticos	<i>Supercritical fluid extraction</i>
SIM	Monitorización de ion seleccionado	<i>Selected-ion monitoring</i>
SLE	Extracción sólido-líquido	<i>Solid-liquid extraction</i>
SPE	Extracción en fase sólida	<i>Solid-phase extraction</i>
SPME	Microextracción en fase sólida	<i>Solid-phase microextraction</i>
SRM	Monitorización de reacción seleccionada	<i>Selected-reaction monitoring</i>
STP	Estación depuradora de aguas residuales	<i>Sewage treatment plant</i>

T

t _{1/2}	Tiempo de vida media	<i>Half-life time</i>
TC	Carbono total	<i>Total carbon</i>
TIC	Corriente iónica total	<i>Total ion current</i>
TOC	Carbono orgánico total	<i>Total organic carbon</i>
TOF	Tiempo de vuelo	<i>Time-of-flight</i>
TP	Producto de transformación	<i>Transformation product</i>
TRB	Terbinafina	<i>Terbinafine</i>
TTri	Toliltriazol	<i>Tolyltriazole</i>

U

UAE	Extracción asistida por ultrasonidos	<i>Ultrasound assisted extraction</i>
UV	Radiación ultravioleta	<i>Ultraviolet radiation</i>
UV-1130	Tinuvín 1130	<i>Tinuvín 1130</i>
UV-234	Tinuvín 234	<i>Tinuvín 234</i>
UV-320	Tinuvín 320	<i>Tinuvín 320</i>
UV-326	Tinuvín 326	<i>Tinuvín 326</i>
UV-327	Tinuvín 327	<i>Tinuvín 327</i>
UV-328	Tinuvín 328	<i>Tinuvín 328</i>
UV-329	Tinuvín 329	<i>Tinuvín 329</i>
UV-350	Tinuvín 350	<i>Tinuvín 350</i>

UV-56	Norbloc 7966	<i>Norbloc 7966</i>
UV-900	Tinuvin 900	<i>Tinuvin 900</i>
UV-P	Tinuvin P	<i>Tinuvin P</i>
V		
v/v	Concentración en volumen	<i>Volume concentration</i>
VP	N- vinilpirrolidona	<i>N- vinylpyrrolidone</i>
W		
WAX	Intercambio aniónico débil	<i>Weak anion exchange</i>
WCX	Intercambio catiónico débil	<i>Weak cation exchange</i>
X		
XTri	5,6-dimetil-1H-benzotriazol	<i>5,6-dimethyl-1H-benzotriazole</i>





SUMMARY



This section is a summary of the contents of this PhD dissertation. It contains (1) the aims of the work, (2) a brief introduction to the studied substances, the main analytical techniques considered and the existing sample preparation methodologies that have been applied so far, and (3) a general overview of the research activities undertaken during the development of this Thesis. The general conclusions of this research are given in a dedicated chapter at the end of this dissertation.

1. AIMS

Important quantities of emerging contaminants (ECs) are introduced every day in urban sewage systems all around the world. Although for most of them it is too soon to determine their toxicity, it is suspected that chronic exposures to these compounds can be dangerous for public health and environment [1]. This situation makes mandatory the availability of analytical methods that permit the identification and quantification of emerging contaminants in water samples. This Thesis is focused on three families of azolic emerging contaminants: benzotriazole corrosion inhibitors, benzotriazole ultraviolet stabilizers and antimycotic drugs. Thus, the aims of the present work are four:

1. To **develop robust, sensitive and selective analytical methodologies** for the determination of the selected emerging contaminants in environmental samples of surface and sewage water, and in sewage sludge.

2. To **quantify the presence of these products in the environment**. Estimating the elimination efficiencies reached at conventional sewage treatment plants (STPs) as well as the accumulation in sludge.

3. To **study the degradability of the studied substances by tertiary water treatments**, such as photodegradation with UV radiation, and establishing the degradation paths followed in this kind of processes.

4. To **look for other emerging contaminants**, not originally selected, that can be present in this kind of environmental samples and might be present in extracts obtained under optimized conditions for azolic compounds.

2. INTRODUCTION

2.1. BENZOTRIAZOLES

It is referred as benzotriazoles a family of compounds integrated by the 1H-benzotriazole (BTri) and its benzyl-substituted derivatives, holding particularly importance the methylated derivatives (tolyltriazoles, TTri). These high volume production chemicals are complexing agents widely used as anticorrosives [2, 3]. For this reason they are part of cooling fluids, aircraft deicing fluids, antifreezes and dishwashing liquids [4-6].

As most of the ECs, benzotriazoles are still under study and there are not enough data to estimate the hazard that they represent. However, toxicological studies have demonstrated that they might be hazardous to plants [7, 8], mutagenic in bacteria cell systems [8] and toxic to some microorganisms [9]. Moreover, BTri has been classified as a suspected human carcinogen [8]. STPs represent one of the most important discharge sources of these compounds into the aquatic media [10-12]. Thus, they have been detected in different aquatic compartments, such as surface, ground or wastewater [4, 5], sludge [13, 14] and sediments [14]. In addition, benzotriazoles appear in indoor environments [15], and even in human urine [16].

Analytical methods for the determination of these pollutants in water samples are based on a pre-concentration step followed by the subsequent separation and detection by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) [5], using triple quadrupole (QqQ) instruments in most of the cases. Regarding sample preparation, solid-phase extraction (SPE), using conventional hydrophilic-lipophilic balanced polymeric materials such as OASIS HLB [10, 16-19] or Strata X [20, 21], remains as the most popular concentration technique for benzotriazoles determination in water samples. Microextraction techniques for these chemicals have just been scarcely investigated. Several coatings for stir-bar sorptive extraction (SBSE) have been tested with efficiencies lower than 1% [22] and only one application of dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME), using tri-n-butylphosphate as extractant and methanol as dispersant, has been developed [23].

2.2. BENZOTRIAZOLE ULTRAVIOLET STABILIZERS

Benzotriazole UV stabilizers (BUVSs), also reported as Tinuvin, constitute a group of compounds part of the family of organic UV light absorbers, which are high volume production chemicals incorporated in a variety of commodities, such as sun screens and other personal care products, paints, surface coatings and building materials, with the aim of retarding light induced degradation reactions [24-27]. Structurally, BUVSs are derivatives of the 2-hydroxybenzotriazole and their main role is to prevent UV photo-induced reactions that take place on surfaces with exposure to the outdoors [28, 29].

The presence of BUVSs in different environmental compartments, from surface water to sludge and biota [30, 31], added to their moderate estrogenic properties [32], has awakened the concern about their potential environmental risks. BUVSs have been identified in sediments from rivers flowing through heavily industrialized areas [33-36] and also in biota samples [33, 37-39], mostly collected in the southeast of Asia. Furthermore, worldwide consumption of BUVSs has been confirmed with the analysis of other matrices, such as dust from indoor atmospheres [40]. Their presence has been also reported in raw sewage water [41-43]. Given that, BUVSs display moderate to high lipophilic properties, it is deemed that they might be accumulated in sludge at STPs. This fact has been recently demonstrated in a monitoring campaign carried out in STPs from 30 Chinese sites [44]. Thus, quantification of BUVSs levels existing in sludge is required to understand their behaviour during sewage treatments and to address the risk of re-introducing these bio-accumulative pollutants in the terrestrial environment, when biosolids from STPs are disposed in agricultural fields.

From an analytical perspective, BUVSs are determined by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) [34, 40, 41], usually with ion-trap mass analyzers. This group of ECs are also amenable to reversed-phase LC analysis; however, some of them are poorly ionized in electrospray ionization sources (ESI), so atmospheric pressure photoionization (APPI) and atmospheric pressure chemical ionization (APCI) sources are applied. Notwithstanding, the main difficulty when determining BUVSs are the complex extracts that are obtained from sewage sludge samples, with which GC-MS can hardly deal. For this reason, although pressurized liquid extraction (PLE) has been applied several times [13, 40, 44], matrix solid-phase dispersion (MSPD) is a good alternative that can provide a higher selectivity [35].

2.3. ANTIMYCOTIC DRUGS

Antimycotics constitute a broad group of drugs designed to treat infections caused by fungi. Most of them are azole or allylamine compounds. These pharmaceuticals are mainly used in topical applications; thus, they can be released from treated skin areas and introduced into urban sewage during showering. In addition to this, some of these drugs are administered orally and intravenously. Therefore, excretion of unmetabolized compounds is another source of antimycotics for the urban sewage system [45, 46].

Given that antimycotics are designed to act as fungi killers, through inhibition of certain enzymes, they might also disturb the endocrine system of aquatic organisms. In fact, azolic compounds interfere with the production of aromatase enzymes, which are responsible for sexual differentiation of vertebrates during larval stages and for the balance between androgenic and estrogenic hormones in mammals [47].

Among the most often-prescribed antimycotic drugs, fluconazole (FCZ) has been detected at similar levels in the inlet and outlet streams of STPs, which suggests resistance to biodegradation [48]. Less polar compounds, such as clotrimazole (CTZ), ketoconazole (KTZ), econazole (ECZ) and miconazole (MCZ), have been also found in wastewater entering municipal STPs [48-50]. Although their levels are significantly reduced in treated wastewater, sludge sorption, and not degradation, appears to be the responsible for such reduction [51, 52]. For these reasons, it is interesting the development of analytical methods for both matrices: sewage water and sludge.

Analytical methods for the determination of antimycotic drugs in environmental water samples usually rely on LC-MS/MS after SPE using reversed-phase type sorbents, like OASIS HLB [49-51] or Strata X [51, 53]. In case of complex sludge samples, extraction techniques should provide quantitative yields and enough selectivity to limit potential variations in the efficiency of the ionization process. PLE [54, 55] and ultrasound-assisted extraction (UAE) [49, 52, 56] have been reported for their extraction from sludge, usually in combination with off-line SPE of the raw extract, after water dilution, using reversed-phase sorbents [49, 54, 56]. However, despite these two-step procedures, most authors have recognized the existence of significant matrix effects during ESI ionization with signal attenuation percentages as high as 70-80% [54].

3. RESEARCH ACTIVITIES AND RESULTS

3.1. BENZOTRIAZOLE CORROSION INHIBITORS AND BUVSs

Within the framework of this PhD, two novel analytical methodologies have been proposed for the determination of BTri, 4-methyl-1H-benzotriazole (4-TTri), 5-methyl-1H-benzotriazole (5-TTri), 5,6-dimethyl-1H-benzotriazole (XTri) and 5-chloro-1H-benzotriazole (5-CIBTri) in water samples. Both strategies include a microextraction step, the first one consists of DLLME with concurrent derivatization, followed by GC-MS analysis, and the second one starts with solid-phase microextraction, with a technical grade polymer, and finishes with LC-MS analysis, with quadrupole-time of flight (QTOF) hybrid analyzer. In addition, an analytical alternative for the determination of BUVSs in sewage sludge, by GC-QTOF-MS/MS, has been developed. Among others, most important species in this family, such as Tinuvin P, Tinuvin 326, Tinuvin 327 and Tinuvin 328, have been included in this research. A brief description of working samples preparation conditions and their most relevant figures of merit are summarized below, under the title of the corresponding published article.

Determination of benzotriazoles in water samples by concurrent derivatization-dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography mass spectrometry

The first research article presents a simple and low-cost procedure, requiring just ten minutes, for the simultaneous extraction and concentration of BTri, 4-TTri, 5TTri, XTri and 5-CIBTri in small amounts of sewage water and river samples.

To this end, 10 mL of sample were combined with 1 mL of Na₂HPO₄ (8%, w/v) and mixed with the ternary acetylation-microextraction mixture, consisting of 100 µL of acetic anhydride, 1.5 mL of acetonitrile and 60 µL of toluene. Thus, analytes were simultaneously acetylated and transferred to the dispersed droplets of toluene in a concurrent acetylation-DLLME process. Separation and detection were performed by GC-MS.

During the optimization of sample preparation conditions, different catalysts (NaHCO₃, Na₂HPO₄ and acetate) were tested, as well as different reaction times for the derivatization with acetic anhydride. Once it was proven that this step could be undertaken simultaneously with the DLLME, extractant and dispersant solvents were selected after considering chlorobenzene,

carbon tetrachloride, 1,1,1-trichloroethane and toluene, as extractants, and methanol, acetone and acetonitrile, as dispersants. Other variables that were considered are the ionic strength of the sample, the extractions time and the centrifugation time.

The proposed methodology achieved limits of quantification (LOQs) between 0.007 ng mL⁻¹ and 0.080 ng mL⁻¹, enrichment factors between 93 and 172 times, good reproducibility, with relative standard deviations lower than 10%, and linearity with determination coefficients above 0.9991 for all compounds in the range between LOQs and 20 ng mL⁻¹. Pseudo-external calibration, with fortified ultrapure water samples submitted to the acetylation-DLLME procedure, proved to be adequate for the accurate quantification of complex aqueous matrices such as surface or wastewater, providing recoveries comprised between 86% and 112%.

Finally, the developed procedure was applied to the analysis of real samples, showing the ubiquity of BTri, 4-TTri and 5-TTri raw and treated sewage water at concentrations up to 1.9 ng mL⁻¹ for BTri, 0.5 ng mL⁻¹ for 4-TTri and 0.6 ng mL⁻¹ for 5-TTri.

Polyethersulfone solid-phase microextraction followed by liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry for benzotriazoles determination in water samples

Alternatively to the standard SPE, which requires the concentration of large sample volumes and is solvent-consuming, and the derivatization-DLLME previously described process, another microextraction method for the determination of the same five benzotriazoles in surface and wastewater samples was developed. In this case, analytes were pre-concentrated using a disposable, low-cost polyethersulfone (PES) sorbent and further analyzed by LC-QTOF-MS.

Under optimized conditions, analytes were extracted from 15 mL of water samples, containing a 30% (w/v) of sodium chloride (4.5 g) and adjusted at pH 4.5, using a tubular PES sorbent (5 cm length x 0.7 mm o.d., sorbent volume 42 µL). The PES tube was attached to the silicone septum of the aluminium crimp cap that covered the vials, bended in a U shape and immersed in the water sample. After finished the extraction step, the polymer was desorbed in methanol and the benzotriazoles present in the extract were determined by high resolution LC-MS, with chromatograms extracted using a mass window of 20 ppm, centered in their [M+H]⁺

ions. The identity of chromatographic peaks was confirmed with accurate ion product scan (MS/MS) spectra.

Parameters affecting the efficiency of sample preparation (extraction conditions and desorption solvent) and those controlling the performance of LC-MS determination were investigated. Once the desorption solvent was chosen (methanol) factorial experimental design, 2^3 type, was used to evaluate the effects of the pH of the sample, its ionic strength and the stirring speed during the extraction. Eventually, time-course of the sorptive extraction was studied, concluding that a time lapse of 6 h was required to attain equilibration conditions.

The method provided LOQs between 0.005 and 0.100 ng mL⁻¹, and relative recoveries from 81% to 124% (except for XTri in sewage samples, ca. 60%) with associated standard deviations between 2% and 9%. When compared with polydimethylsiloxane covered stir-bars (coating volume 24 µL), the PES polymer achieved significant higher responses (5- to 20-fold) for these polar pollutants.

When applying the method to real samples, BTri, 4-TTri and 5-TTri were found in urban sewage and river water, affected by wastewater discharges, with the maximum concentration (5.9 ng mL⁻¹) corresponding to BTri in raw wastewater.

Gas chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry determination of benzotriazole UV stabilizers in sludge samples

In this research, target compounds are the lipophilic 2-hydroxyphenyl-derivatives of the BTri, which tend to sediment with particulate matter during sewage water treatment and, therefore, are concentrated in sewage sludge. Selected BUVSs for this work are: Tinuvin P (UV-P), Tinuvin 234 (UV-234), Tinuvin 320 (UV-320), Tinuvin 326 (UV-326), Tinuvin 327 (UV-327), Tinuvin 328 (UV-328), Tinuvin 329 (UV-329), Tinuvin 350 (UV-350) and Norbloc 7966 (UV-56).

PLE is the sample preparation technique preferred for the extraction of these chemicals from sewage sludge samples. The main drawback of this kind of processes is that they require an important investment in equipment and solvents to obtain extracts that, sometimes, are too complex to be analyzed by GC-MS. In this work a simplified procedure for the selective determination of these BUVSs in sludge from urban STPs is presented.

Analytes were extracted from the sample by MSPD and further determined using GC-QTOF-MS/MS. Highly selective chromatographic records were attained considering a mass window of 0.005 daltons (Da), centred in the quantification product ion corresponding to each compound. Moreover, the availability of accurate ion product scan MS/MS spectra permitted to confirm the identities of peaks observed in extracted ion MS/MS chromatograms. As a result, a straightforward sample preparation procedure combining extraction and clean-up in the same step, and consuming just 10 mL of ethyl acetate, sufficed to deal with complex sludge samples. The developed method attained limits of quantification (LOQs) between 2 ng g⁻¹ and 10 ng g⁻¹, referred to freeze-dried sludge, and recoveries from 70% to 111%, with standard deviations from 2% to 13%.

Analysis of sludge samples and certified reference materials confirmed the existence of residues of eight out of nine BUVs. UV-326, UV-328 and UV-234 displayed the highest occurrence frequencies and individual concentrations above 100 ng g⁻¹ in several samples.

3.2. ANTIMYCOTIC DRUGS

This PhD has considered the determination of antimycotic drugs in all the matrices involved in the sewage treatment plant process: wastewater and sludge. Seven chemicals have been selected: clotrimazole (CTZ), econazole (ECZ), etaconazole (ETZ), fluconazole (FCZ), ketoconazole (KTZ), miconazole (MCZ) and terbinafine (TRB). For the analysis of water samples a SPE protocol has been proposed, while for the sewage sludge a MSPD process followed by SPE on-line clean-up was developed. Extracts obtained by both methodologies were analyzed in a LC-QTOF-MS/MS system. In this two works, the high-resolution capabilities of the QTOF analyzer were also utilized for the screening of other ECs that could have been extracted from both kind of samples. Moreover, the stability of the most important antimycotic drugs was studied in a third work, in what new substances, generated during degradation reactions, were identified with the LC-QTOF-MS/MS instrument and their relative toxicities (versus the precursor drug) assessed using software tools.

Selective determination of antimycotic drugs in environmental water samples by mixed-mode solid-phase extraction and liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry

In this research, the suitability of mixed-mode (reversed-phase and cationic exchange) SPE for the selective concentration of basic antimycotic drugs (belonging to triazole, imidazole and allylamine chemical classes) in environmental water samples has been demonstrated for first time. The use of a sequential elution protocol, allowing the removal of neutral and acidic interferences before analytes extraction, led to a significant reduction of matrix effects, during ESI ionization, in comparison with results reported for reversed-phase sorbents.

Under optimized conditions, samples were adjusted to pH 3 and mixed with a 5% (v:v) of methanol. Thereafter, the considered volume (from 150 to 500 mL, depending on the matrix) was passed through an OASIS MCX cartridge, triggering the concentration of the analytes. Once the sorbent was dry, neutral and acidic compounds were removed by rinsing the cartridge with 2.5 mL of methanol (0.1% in formic acid). Finally, antimycotic drugs were recovered with 2 mL of methanol containing a 2% (v:v) of NH_3 .

The combination of this protocol with LC-QTOF-MS/MS determination attained LOQs comprised between 2 and 15 ng L^{-1} . After internal surrogate correction, accurate results (in most cases, recoveries ranged between 75 and 117%) were obtained for spiked aliquots of raw and treated wastewater, as well as river water, using quantification against calibration standard solutions in methanol (2% in NH_3). Accurate, scan MS/MS spectra allowed the unambiguous identification of target compounds in environmental samples. FCZ, KTZ, MCZ and CTZ were measured in wastewater samples at concentrations up to 200 ng L^{-1} .

Furthermore, the information contained in MS spectra was used for the screening of additional antimycotics in the processed samples, finding systematically another antimycotic drug that had not been initially considered, climbazole (CBZ). This compound was present in all the processed samples.

Selective extraction of antimycotic drugs from sludge samples using matrix solid-phase dispersion followed by on-line clean-up

In this study, an effective and selective, modular sample preparation method for the extraction of the seven antimycotic drugs studied in the previous work, plus CBZ, from digested sludge samples is proposed. To this end, MSPD was on-line connected with a cationic exchanger SPE cartridge (Bond Elut SCX). The content of the MSPD cartridge was 0.5 g of the freeze-dried sludge sample, dispersed with C₁₈, plus a clean-up layer of primary and secondary amine (PSA) sorbent. Analytes were extracted with 10 mL of methanol, flowing this extract also through the SPE cartridge, where target compounds remained trapped whilst neutral interferences were released. After discarding the MSPD syringe, analytes were recovered with 10 mL of methanol (0.5% in NH₃) before LC-QTOF-MS/MS determination.

In the optimization of this procedure the extraction efficiencies of four different solvents were compared: methanol, methanol 0.1% in formic acid, acetonitrile and ethyl acetate. Also, different SPE cartridges, displaying cationic exchange interactions, were tested: Bond Elut SCX, Bond Elut CBA and OASIS MCX. Once this had been undertaken, the effects of the mass of C₁₈, the mass of PSA and the volume of extractant solvent in the responses of target compounds were investigated with a Box-Behnken factorial design.

In comparison with previously published sample preparation methodologies, the developed approach greatly simplifies sample handling and reduces attenuation of ESI ionization for sample extracts when compared to standard solutions. The obtained absolute recoveries ranged between 70% and 118%, and the LOQs of the method varied between 5 and 8 ng g⁻¹. In the analysis of real samples, CBZ, CTZ, KTZ and MCZ were ubiquitous in urban sludge, with maximum average concentrations (above 400 ng g⁻¹) corresponding to CTZ.

The screening capabilities of the LC-QTOF-MS system demonstrated that the developed modular extraction and purification methodology might be useful for the selective extraction of other basic drugs from sludge, finding sertraline, amitriptyline and amiodarone ubiquitous in all the extracts.

Identification of antimycotic drugs transformation products upon UV exposure

The stability of three of the antimycotic drugs (CTZ, KTZ and MCZ), previously detected in sewage water and sludge, upon exposure to UV radiation, employed as tertiary wastewater treatment in some STPs and also present in sunlight, was investigated.

First, precursor compounds were immobilized in a silicone support, which was further exposed to UV light at two different wavelengths: 254 and 365 nm. Analytes, precursor drugs and their potential transformation products (TPs), were recovered from the supports soaking them in 0.5 mL of acetonitrile. Thereafter, the extract was injected in the same LC-QTOF-MS/MS instrument. This way, identification of the arising transformation products (TPs) and evaluation of their time-courses were investigated.

It was demonstrated that the three antimycotics can be largely degraded upon UV exposure, displaying similar stabilities when exposed to 254 nm light; however, CTZ was significantly more stable than MCZ and KTZ when irradiated with the 365 nm lamp. TPs identified in silicone supports resulted from de-chlorination, cleavage, intra-molecular cyclization and hydroxylation reactions. Many of these species were also detected when exposing other solid matrices, such as sand and agricultural soil, previously spiked with target compounds, to UV light.

The 50% estimated lethal concentration, calculated using the 48-h *Daphnia Magna* test, for the two main TPs of CTZ and MCZ, at both wavelengths, were lower than those corresponding to the precursor drugs.

Results obtained in each of these research lines have been compiled in six research original articles, which have been published in well-reputed journals. All of them fall in the upper quartile within the categories of Analytical Chemistry (five articles) and Environment (one article).

4. REFERENCES

- [1] D. Barceló, Trends in Analytical Chemistry 22 (2003) xiv-xvi.
- [2] H.B. Madsen, Studies in Conservation 12 (1967) 163-167.
- [3] C. Sease, Studies in Conservation 23 (1978) 76-85.

- [4] S.D. Richardson, T.A. Ternes, *Analytical Chemistry* 83 (2011) 4614-4648.
- [5] S.D. Richardson, *Analytical Chemistry* 84 (2012) 747-778.
- [6] W. Vetter, J. Lorenz, *Environmental Science and Pollution Research* 20 (2013) 4435-4440.
- [7] S. Castro, L.C. Davis, L.E. Erickson, *International Journal of Phytoremediation* 5 (2003) 245-265.
- [8] 1,2,3-Benzotriazole, publication no. 2000/14OSH., Health Council of the Netherlands: Dutch Expert Committee on Occupational Standards, The Hague, 2000.
- [9] J.S. Cornell, D.A. Pillard, M.T. Hernandez, *Environmental Toxicology and Chemistry* 19 (2000) 1465-1472.
- [10] S. Weiss, T. Reemtsma, *Analytical Chemistry* 77 (2005) 7415-7420.
- [11] S. Weiss, J. Jakobs, T. Reemtsma, *Environmental Science and Technology* 40 (2006) 7193-7199.
- [12] T. Reemtsma, S. Weiss, J. Mueller, M. Petrovic, S. González, D. Barceló, F. Ventura, T.P. Knepper, *Environmental Science and Technology* 40 (2006) 5451-5458.
- [13] Y.S. Liu, G.G. Ying, A. Shareef, R.S. Kookana, *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 5328-5335.
- [14] Z. Zhang, H. Yang, G. Wu, Z. Li, T. Song, X.Q. Li, *European Journal of Medicinal Chemistry* 46 (2011) 3909-3916.
- [15] L. Wang, A.G. Asimakopoulos, H.B. Moon, H. Nakata, K. Kannan, *Environmental Science and Technology* 47 (2013) 4752-4759.
- [16] A.G. Asimakopoulos, A.A. Bletsou, Q. Wu, N.S. Thomaidis, K. Kannan, *Analytical Chemistry* 85 (2013) 441-448.
- [17] W. Giger, C. Schaffner, H.P. Kohler, *Environmental Science and Technology* 40 (2006) 7186-7192.
- [18] D. Voutsas, P. Hartmann, C. Schaffner, W. Giger, *Environmental Science and Pollution Research International* 13 (2006) 333-341.
- [19] J.A. van Leerdam, A.C. Hogenboom, M.M.E. van der Kooi, P. de Voogt, *International Journal of Mass Spectrometry* 282 (2009) 99-107.
- [20] C. Domínguez, C. Reyes-Contreras, J.M. Bayona, *Journal of Chromatography A* 1230 (2012) 117-122.
- [21] V. Matamoros, E. Jover, J.M. Bayona, *Analytical Chemistry* 82 (2010) 699-706.

- [22] N. Gilart, N. Miralles, R.M. Marcé, F. Borrull, N. Fontanals, *Analytica Chimica Acta* 774 (2013) 51-60.
- [23] M.T. Pena, X. Vecino-Bello, M.C. Casais, M.C. Mejuto, R. Cela, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 402 (2012) 1679-1695.
- [24] M. Monteiro, C. Nerín, F.G.R. Reyes, *Packaging Technology and Science* 12 (1999) 241-248.
- [25] Screening-level Hazard Characterization Sponsored Chemicals: Phenolic Benzotriazoles Category, U.S. Environmental Protection Agency, 2009.
- [26] High production volume (HPV) challenge program. Data summary and test plan for phenolic benzotriazoles, U.S. Environmental Protection Agency, 2001.
- [27] M. Himmelsbach, W. Buchberger, E. Reingruber, *Polymer Degradation and Stability* 94 (2009) 1213-1219.
- [28] J.C. Crawford, *Progress in Polymer Science* 24 (1999) 7-43.
- [29] Á. Garrido-López, M.T. Tena, *Journal of Chromatography A* 1099 (2005) 75-83.
- [30] P. Gago-Ferrero, M.S. Díaz-Cruz, D. Barcelo, *Analytical Methods* 5 (2013) 355-366.
- [31] D.L. Giokas, A. Salvador, A. Chisvert, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 26 (2007) 360-374.
- [32] M.S. Díaz-Cruz, D. Barceló, *Trends in Analytical Chemistry* 28 (2009) 708-717.
- [33] H. Nakata, S. Murata, J. Filatreau, *Environmental Science and Technology* 43 (2009) 6920-6926.
- [34] Y. Kameda, K. Kimura, M. Miyazaki, *Environmental Pollution* 159 (2011) 1570-1576.
- [35] I. Carpinteiro, B. Abuín, M. Ramil, I. Rodríguez, R. Cela, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 402 (2012) 519-527.
- [36] Z. Zhang, N. Ren, Y.-F. Li, T. Kunisue, D. Gao, K. Kannan, *Environmental Science and Technology* 45 (2011) 3909-3916.
- [37] H. Nakata, R.-i. Shinohara, S. Murata, M. Watanabe, *Journal of Environmental Monitoring* 12 (2010) 2088-2092.
- [38] J.-W. Kim, B.R. Ramaswamy, K.-H. Chang, T. Isobe, S. Tanabe, *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 3511-3520.
- [39] J.-W. Kim, T. Isobe, B.R. Ramaswamy, K.-H. Chang, A. Amano, T.M. Miller, F.P. Siringan, S. Tanabe, *Chemosphere* 85 (2011) 751-758.

- [40] I. Carpinteiro, B. Abuín, I. Rodríguez, M. Ramil, R. Cela, *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 3729-3735.
- [41] I. Carpinteiro, B. Abuín, I. Rodríguez, R. Cela, M. Ramil, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397 (2010) 829-839.
- [42] I. Carpinteiro, M. Ramil, I. Rodríguez, J.M.F. Nogueira, *Journal of Separation Science* 35 (2012) 459-467.
- [43] S. Montesdeoca-Esponda, Z. Sosa-Ferrera, J.J. Santana-Rodríguez, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 403 (2012) 867-876.
- [44] T. Ruan, R. Liu, Q. Fu, T. Wang, Y. Wang, S. Song, P. Wang, M. Teng, G. Jiang, *Environmental Science and Technology* 46 (2012) 2071-2079.
- [45] Q. Sui, B. Wang, W. Zhao, J. Huang, G. Yu, S. Deng, Z. Qiu, S. Lu, *Chemosphere* 89 (2012) 280-286.
- [46] F. Heeb, H. Singer, B. Pernet-Coudrier, W. Qi, H. Liu, P. Longrée, B. Müller, M. Berg, *Environmental Science and Technology* 46 (2012) 8680-8688.
- [47] J.A. Zarn, B.J. Brüschweiler, J.R. Schlatter, *Environmental Health Perspectives* 111 (2003) 255-261.
- [48] M. Kahle, I.J. Buerge, A. Hauser, M.D. Muller, T. Poiger, *Environmental Science and Technology* 42 (2008) 7193-7200.
- [49] Q. Huang, Y. Yu, C. Tang, X. Peng, *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 3481-3488.
- [50] X. Peng, Q. Huang, K. Zhang, Y. Yu, Z. Wang, C. Wang, *Science of The Total Environment* 426 (2012) 311-317.
- [51] M. Peschka, P. Roberts, T. Knepper, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389 (2007) 959-968.
- [52] A.I. García-Valcárcel, J.L. Tadeo, *Journal of Separation Science* 34 (2011) 1228-1235.
- [53] P.H. Roberts, K.V. Thomas, *Science of The Total Environment* 356 (2006) 143-153.
- [54] A. Wick, G. Fink, T.A. Ternes, *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 2088-2103.
- [55] L. Barron, J. Tobin, B. Paull, *Journal of Environmental Monitoring* 10 (2008) 353-361.
- [56] R.H. Lindberg, J. Fick, M. Tysklind, *Water Research* 44 (2010) 649-657.

I. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



Los últimos desarrollos en análisis instrumental han permitido la identificación de una serie de sustancias químicas presentes en muestras medioambientales en concentraciones muy pequeñas, que no habían sido detectadas previamente. Se trata de componentes de multitud de productos que utilizamos en nuestra vida diaria por lo que son introducidos en el medio continuamente [1]. Esto conlleva que, aunque sólo algunos de ellos sean persistentes, su detección en muestras esté siendo continua. Además, algunos de estos compuestos presentan un riesgo potencial para la salud pública y el medio ambiente, aún cuando todavía no se ha podido cuantificar la magnitud de esta amenaza. Estos productos son los denominados contaminantes emergentes.

Las muestras medioambientales son altamente complejas, por tanto, el principal desafío que implican las investigaciones en torno a los contaminantes emergentes es disponer de los instrumentos y las metodologías necesarias para poder identificar y medir concentraciones extremadamente pequeñas de estas sustancias, que se encuentran rodeadas de muchos otros compuestos químicos en concentraciones mucho más elevadas. Por otro lado, el número potencial de contaminantes emergentes es ingente, lo que implica que los métodos de análisis dirigidos se centren en determinadas familias o grupos de compuestos. Dichas familias o grupos suelen establecerse en base a dos criterios diferentes: estructura química similar o bien aplicaciones comunes.

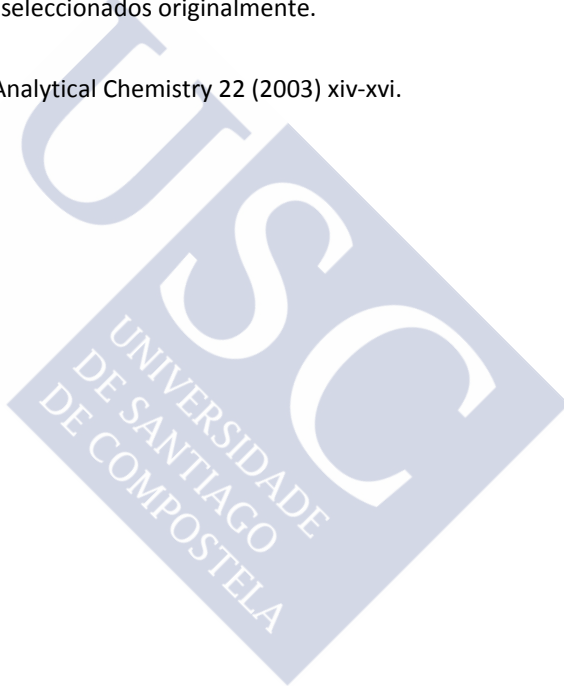
En esta Tesis Doctoral se han estudiado tres familias de contaminantes emergentes: benzotriazoles inhibidores de corrosión, estabilizadores ultravioleta basados en el benzotriazol y fármacos antimicóticos azólicos. Se trata, por tanto, de tres grupos de compuestos azólicos. La mayor parte de los trabajos se basa en análisis mediante sistemas de espectrometría de masas híbridos cuadrupolo-tiempo de vuelo (QTOF).

Los objetivos de este trabajo se pueden resumir en cuatro puntos:

- Desarrollo de metodologías analíticas, suficientemente sensibles, selectivas y robustas, para la determinación de los contaminantes emergentes seleccionados en muestras medioambientales de agua superficial, como ríos, lagos y sedimentos fluviales, y en muestras de estaciones depuradoras de aguas residuales, como efluentes, influentes y lodos.

- Estudio cuantitativo de la presencia de estos productos en el medio ambiente. Realizando estimaciones de los rendimientos de eliminación alcanzados mediante procesos convencionales de tratamiento de aguas residuales urbanas o investigando su potencial acumulación en lodos.
- Investigación de la degradabilidad de las sustancias estudiadas mediante tratamientos terciarios, tales como la fotólisis inducida por radiación ultravioleta, y establecimiento de las rutas de degradación seguidas durante este tipo de procesos.
- Búsqueda de otros contaminantes emergentes presentes en las muestras medioambientales no preseleccionados originalmente.

[1] D. Barceló, Trends in Analytical Chemistry 22 (2003) xiv-xvi.



II. INTRODUCCIÓN



II. A. SUSTANCIAS QUÍMICAS ESTUDIADAS



1. CONTAMINANTES EMERGENTES EN EL MEDIO AMBIENTE

Sin ser completamente conscientes de ello, estamos en contacto continuo con contaminantes emergentes (*emerging contaminant*, EC). **Fármacos**, tales como antiinflamatorios, antidepresivos, antimicóticos u hormonas sintéticas; **productos de higiene personal**, como protectores solares, o bactericidas, presentes en champús y perfumes que utilizamos en nuestra vida diaria; **detergentes y aditivos de plásticos** y otros polímeros, como retardantes de llama, filtros y estabilizadores ultravioleta, presentes en objetos que tenemos en nuestros hogares y en el lugar de trabajo; **inhibidores de procesos de degradación**, corrosión u oxidación de materiales necesarios en las industrias; algunos **pesticidas** y **antibióticos** que se aplican en la agricultura y la ganadería; e incluso **productos de degradación** generados en los procesos de desinfección del agua potable; así como **microorganismos** y **nanomateriales**, configuran la lista de ECs [1, 2].

Además, la globalización ha contribuido a que los mismos compuestos hayan aparecido simultáneamente en diferentes partes del mundo, siendo mayor el número de casos detectados en Europa [3, 4] y América del Norte [5].

Los ECs llegan a las estaciones depuradoras de aguas residuales (*sewage treatment plants*, STPs) a través de los efluentes urbanos y, en muchos casos, presentan persistencia y sobreviven a los tratamientos convencionales aplicados en estas plantas [6]. Por ello han sido encontrados en los efluentes de las STPs, así como en los lodos generados en los procesos de depuración. A través de las descargas de estas plantas, los ECs pueden desplazarse a aguas superficiales, como ríos y lagos, o hasta el suelo agrícola, al regar los campos con agua residual tratada [7] y/o abonarlos con fertilizantes que contienen lodo estabilizado. Una vez allí, estos productos se filtran hacia aguas subterráneas, pudiendo llegar a contaminar manantiales, o dirigirse de nuevo hacia aguas superficiales, o incluso incorporarse a las cadenas tróficas a través de invertebrados que viven en el suelo y de las raíces de los vegetales [8]. El ciclo seguido por los ECs en el medio acuático se representa en la **Figura II.A.1**.

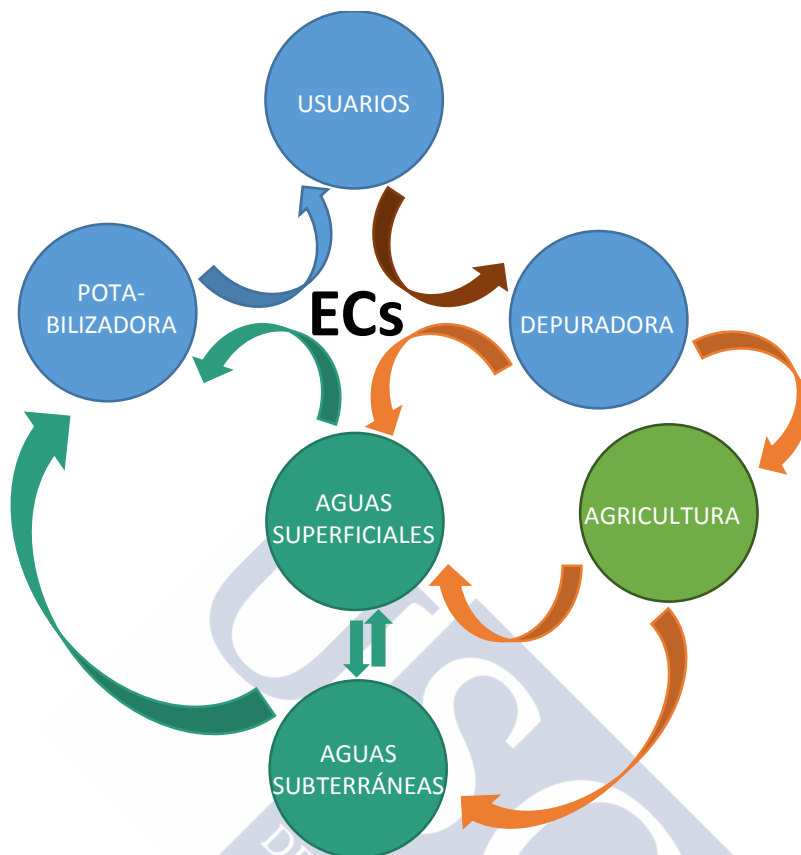


Figura II.A.1. Ciclo seguido por los contaminantes emergentes en el medio acuático

Algunos ECs han llegado a ser encontrados en agua potable [9], por lo que la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América (*Environmental Protection Agency*, EPA), uno de los organismos más activos en investigación y prevención sobre ECs, ha publicado listas [10] de contaminantes que no han sido regulados aún pero que están presentes en agua de consumo público y deben ser regulados en el futuro por leyes federales, como el Acta de Seguridad del Agua Potable (*Safe Drinking Water Act*, SDWA) [11].

Por su parte, la Unión Europea ha establecido un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas mediante la directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo [12]. En esta ley se estableció una lista de 33 sustancias prioritarias, a la que año tras año se han ido incorporado otras, para las que se fijan niveles máximos de concentración en aguas superficiales. Aunque la mayor parte de los productos incluidos en la primera versión de esta lista son contaminantes convencionales prioritarios como hidrocarburos aromáticos

policíclicos (*polycyclic aromatic hydrocarbons*, PAHs) o herbicidas, también se recogen algunos contaminantes emergentes como (polibromo) difeniléteres (*polybrominated diphenylether*, PBDE) o fluorosurfactantes como el ácido prefluorooctanosulfónico (*perfluorooctanesulfonic acid*, PFOS).

En los últimos años han comenzado a conocerse algunos de los peligros de ciertos ECs. Es el caso de los denominados disruptores endocrinos, de los que ya se han publicado estudios que muestran cómo estas sustancias inducen la feminización de peces al alterar su actividad hormonal [13, 14]. De todas maneras, hoy en día se considera que no se dispone de información ecotoxicológica suficiente como para estimar los riesgos que representan los ECs para el medio ambiente [15]. A pesar de ello, la última corrección aprobada por la Comisión Europea sobre directiva 2000/60/CE, la decisión 2015/495 [16], establece una *Watch-list* con nuevos límites para algunos ECs: hormonas como estrona, estradiol y etinilestradiol, diclofenaco, butilhidroxitolueno (*butylated hydroxytoluene*, BHT), 2-etilhexil 4-metoxicinamato (*2-ethylhexyl 4-methoxycinnamate*, EHMC), antibióticos macrólidos y pesticidas como metiocarb trialato, oxadiazón y neonicotinoides.

En esta Tesis Doctoral se han desarrollado las metodologías analíticas necesarias para la determinación de tres grupos de contaminantes emergentes: inhibidores de corrosión y estabilizadores ultravioleta, basados en el benzotriazol, y fármacos antimicóticos azólicos. Asimismo, se han aplicado estos procedimientos para el análisis cuantitativo de estos compuestos químicos en muestras medioambientales. Además, se han llevado a cabo estudios de estabilidad y se han establecido las principales rutas de degradación seguidas por los fármacos antimicóticos estudiados. A continuación, se presenta información relevante acerca de las propiedades físico-químicas, toxicidad y distribución medioambiental de estas sustancias.

2. BENZOTRIAZOLES

2.1. DEFINICIÓN Y USOS

Se conoce como benzotriazoles al 1H-benzotriazol (BTri) y a sus derivados benzo-sustituídos, principalmente los metilados (*tolyltriazoles*, TTri). Esta familia de ECs son agentes complejantes que actúan como inhibidores de procesos de corrosión [17, 18]. Por este motivo están presentes en líquidos refrigerantes, descongelantes aplicados en aviación (*aircraft deicing fluid*, ADF), anticongelantes y productos lavavajillas [19-21].

Los benzotriazoles están clasificados como productos químicos producidos en grandes volúmenes (high production volume chemicals, HPV) [22]. Se estima que en los aeropuertos con mayor tráfico aéreo se llegan a consumir entre 1000 y 10000 toneladas de ADF cada invierno [23, 24]. Según Cancilla et al. [25], en el General Mitchell International Airport (Wisconsin, USA) se vertieron 288 toneladas de ADF durante los meses de diciembre de 1998 y enero de 1999.

2.2. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

La estructura del BTri consiste en la fusión de un anillo bencénico y uno triazólico, con los dos átomos de carbono del triazol funcionando como puente y con el N₁ sustituido con un átomo de hidrógeno, tal y como se muestra en la **Figura II.A.2**. En esta Tesis se han considerado además del BTri, el 4-metil-1H-benzotriazol (4-TTri), el 5-metil-1H-benzotriazol (5-TTri), el 5,6-dimetil-1H-benzotriazol (XTri) y el 5-cloro-1H-benzotriazol (5-ClBTri), **Figura II.A.2**.

Las propiedades físico-químicas de estas sustancias están resumidas en la **Tabla II.A.1**. Se trata de compuestos sólidos, polares o muy polares, con puntos de ebullición altos y con altas solubilidades en agua. En cuanto a sus propiedades ácido-base, son sustancias anfotéricas que poseen un hidrógeno ácido unido al N₁ y un centro básico en los N₂-N₃. El pK_a del hidrógeno ácido está en torno a 8, es decir, a valores de pH inferiores a 8, este hidrógeno se mantiene unido a la molécula, mientras que el pK_a del centro básico se sitúa entre 0 y 1.9, es decir, a valores de pH superiores a 2 la molécula no se protona. Son compuestos poco volátiles (presión de vapor 3.1×10^{-4} - 2.5×10^{-5} Torr).

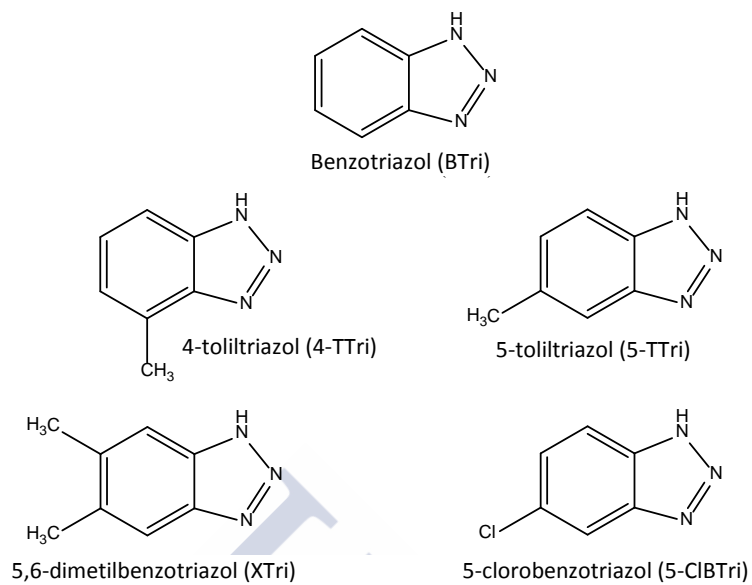


Figura II.A.2. Estructura de los benzotriazoles estudiados



Tabla II.A.1. Propiedades físico-químicas de los benzotriazoles estudiados tomadas de la base de datos ChemSpider [26]

Compuesto	Abv	CAS	Fórmula	Peso molecular	log K _{ow}	pK _a	Presión de vapor* (Torr)	Solubilidad (g·L ⁻¹) (pH 7, 25 °C)
Benzotriazol	BTri	95-14-7	C ₆ H ₅ N ₃	119.12	1.44	1.17 ^b 8.37 ^a	2.5x10 ⁻⁵	21
4-Tolilitriazol	4-TTri	29878-31-7	C ₇ H ₇ N ₃	133.15	1.71	1.65 ^b 8.74 ^a	3.1x10 ⁻⁴	11
5-Tolilitriazol	5-TTri	136-85-6	C ₇ H ₇ N ₃	133.15	1.71	1.65 ^b 8.74 ^a	3.1x10 ⁻⁴	10
5,6-dimetilbenzotriazol	XTri	4184-79-6	C ₈ H ₉ N ₃	147.18	2.25	1.89 ^b 8.92 ^a	7.6x10 ⁻⁵	5
5-clorobenzotriazol	5-CIBTri	94-97-3	C ₆ H ₄ ClN ₃	153.57	2.13	-0.04 ^b 7.46 ^a	1.1x10 ⁻⁴	6

^a pK_a para el grupo más ácido^b pK_a para el grupo más básico

*Valores estimados con EPI suite [27]

2.3. TOXICIDAD Y DISTRIBUCIÓN EN EL MEDIO AMBIENTE

Tal y como ocurre para la mayoría de los ECs, los benzotriazoles son una familia de compuestos en estudio y todavía no se dispone de suficientes datos para estimar sus riesgos. Sin embargo, investigaciones toxicológicas han demostrado que pueden ser peligrosos para las plantas [28, 29]. Además, Cancilla et al. [30] concluyeron que el BTri favorece la degradación anaeróbica de diferentes glicoles, dando lugar a sustancias tóxicas, y midieron su concentración letal media (LC₅₀) en dos especies acuáticas: *Pimephales promelas*, un pez, y *Ceriodaphnia dubia*, un crustáceo; resultando 65 µg mL⁻¹ y 102 µg mL⁻¹, respectivamente. Posteriormente, determinaron la LC₅₀ para el 5-TTri en *Pimephales promelas*, *Ceriodaphnia dubia* y *Selenastrum capricornutum*, un alga, resultando éstas 22 µg mL⁻¹, 81.3 µg mL⁻¹ y 23.2 µg mL⁻¹, respectivamente [25]. El BTri también ha sido clasificado como disruptor endocrino [31, 32] y se han descrito sus efectos mutagénicos [29] y carcinogénicos [29, 33]. Asimismo, al BTri se le ha atribuido la responsabilidad de la aparición de malformaciones en *Ciona intestinales*, un invertebrado marino [34].

Por otra parte, los benzotriazoles son compuestos muy estables, con tiempos de vida media (t_{1/2}) elevados en agua residual, 114-315 días para el BTri, 14-128 días para el 5-TTri y 26-96 días para el 5-CIBTri [35]. Por ello, tienden a acumularse con facilidad en los alrededores de las zonas industriales donde son utilizados y en los aeropuertos donde se aplican [36]. Además, al no ser completamente degradados mediante tratamientos convencionales de aguas residuales, los efluentes de las plantas de tratamiento de residuos industriales contribuyen a la expansión de estos contaminantes en el medio acuático [37, 38]. Otra fuente importante de estos productos son los efluentes de STPs urbanas [39-41]. Debido a la elevada polaridad de los benzotriazoles, estos compuestos se transportan con gran facilidad a través de las aguas superficiales continentales [42, 43] hacia el mar [44, 45], pudiendo filtrarse hacia aguas subterráneas [19, 20, 46-48], y llegando a aparecer en muestras de agua potable [49]. Estas sustancias han sido detectadas también en lodos procedentes de STPs [48, 50], sedimentos [50], atmósferas interiores [51] e incluso en orina [52]. En la **Tabla II.A.2** se resumen algunos de los rangos de concentración medidos para benzotriazoles en muestras de agua.

A. SUSTANCIAS QUÍMICAS ESTUDIADAS

Tabla II.A.2 Niveles de benzotriazoles encontrados en muestras de agua

Compuesto	Muestra	País	Año	Concentración (ng mL ⁻¹)			Ref
				Influyente	Efluente	Agua superficial	
BTri	Aeropuerto	Canadá	1998	-	-	126	[53]
	STP Río Glatt	Suiza	2002	13-75	11-100	0.64-3.69	[54]
	Río Glatt	Suiza	2003	-	-	0.16-5.44	[42]
	Río Rin	Suiza	2003	-	-	0.22-0.4	[42]
	Río Aare	Suiza	2003	-	-	0.21-0.45	[42]
	Río Aabach	Suiza	2003	-	-	0.2-2.87	[42]
	Río Ródano	Suiza	2003	-	-	0.06-1.38	[42]
	Río Limago	Suiza	2003	-	-	0.12-0.51	[42]
	STP Berlín	Alemania	2005	11.9	9.6	3.4	[39]
	STP Barcelona	España	2009	7.29	2.44	1.08	[37]
	STP	Holanda	2009	-	8	0.1	[55]
	STP Río Leine	Alemania	2009	-	3.85	0.67	[44]
	Mar Báltico	Alemania	2009	-	-	0.029	[44]
	STP Río Erewash	UK	2010	-	4	-	[49]
	Río	Europa	2010	-	-	0.23-8.00	[43]
	Río Elba	Alemania	2011	-	-	0.09-0.30	[45]
	Río Weser	Alemania	2011	-	-	0.03-0.22	[45]
	Mar del Norte	Alemania	2011	-	-	0.02-0.10	[45]
	STP Adelaide	Australia	2011	-	2.21	-	[48]
STP Río Sar	España	2012	10.02	0.27	0.04	[38]	
4-TTri 5-TTri*	Aeropuerto	Canadá	1998	-	-	198	[53]
	STP Río Glatt	Suiza	2002	0.2-5.6	0.1-3.8	0.12-0.63	[54]
	Aeropuerto General Mitchell	WI USA	2003	-	-	1410-3830	[25]
	Río Glatt	Suiza	2003	-	-	0.04-0.91	[42]
	Río Rin	Suiza	2003	-	-	0.05-0.15	[42]
	Río Aare	Suiza	2003	-	-	0.06-0.15	[42]
	Río Aabach	Suiza	2003	-	-	0.09-0.44	[42]
	Río Ródano	Suiza	2003	-	-	0.01-0.09	[42]
	Río Limago	Suiza	2003	-	-	0.02-0.11	[42]
	STP Berlín	Alemania	2005	4.7	2.1	0.2	[39]
	STP Barcelona	España	2009	n.d	n.d.	2.48	[37]
	STP	Holanda	2009	-	3	0.1	[55]

n.d. no detectado

*Concentraciones suma 4-TTri + 5-TTri

Tabla II.A.2 (continuación). Niveles de benzotriazoles encontrados en muestras de agua

Compuesto	Muestra	País	Año	Concentración (ng mL ⁻¹)			Ref
				Influyente	Efluente	Agua superficial	
4-TTri 5-TTri*	STP Río Leine	Alemania	2009	-	4.80	0.74	[44]
	Mar Báltico	Alemania	2009	-	-	0.037	[44]
	STP Río Erewash	UK	2010	-	0.84	-	[49]
	Río Elba	Alemania	2011	-	-	0.05-0.28	[45]
	Río Weser	Alemania	2011	-	-	0.02-0.52	[45]
	Mar del Norte	Alemania	2011	-	-	0.02-0.20	[45]
	STP Adelaide	Australia	2011	-	0.37	-	[48]
	STP Río Sar	España	2012	2.3	2.01	0.21	[38]
	STP	España	2012	6.6	n.d.	n.d.	[56]
XTri	STP Berlín	Alemania	2005	0.02	0.01	<0.01	[39]
	STP	Holanda	2009	-	n.d.	1.5	[55]
	STP Adelaide	Australia	2011	-	0.1	-	[48]
5-CIBTri	STP Adelaide	Australia	2011	-	0.08	-	[48]
	STP	España	2012	13.8	n.d.	n.d.	[56]

n.d. no detectado

*Concentraciones suma 4-TTri + 5-TTri



3. ESTABILIZADORES ULTRAVIOLETA BENZOTRIAZÓLICOS

3.1. DEFINICIÓN Y USOS

Los estabilizadores ultravioleta derivados del benzotriazol (*benzotriazole ultraviolet stabilizers*, BUVSs), comercializados por BASF bajo la marca Tinuvin[®], son una familia de ECs capaces de evitar las reacciones desencadenadas por la radiación UV en superficies [57, 58]. Por este motivo se adicionan a plásticos, pinturas y otros materiales poliméricos, usados principalmente en ambientes exteriores, previniéndose de esta manera su descomposición o decoloración [59-62].

Según Smith et al. [63], los materiales poliméricos contienen, de manera general, entre un 0.1 y un 10% en peso de aditivos, de los que una parte importante son BUVSs. Uno de los más extendidos, el Tinuvin[®] P (UV-P), ha sido medido en concentraciones de entre el 0.2 y el 0.3% en el poliestireno y de 0.01% en botellas de tereftalato de polietileno (*polyethylene terephthalate*, PET) [59, 63]. Además, concentraciones de hasta el 0.65% del Tinuvin[®] 234 (UV-234) han sido encontradas en resinas acrílicas [64], de hasta el 0.97% del Tinuvin[®] 1130 (UV-1130) en pintura para automóviles [64] y de hasta el 0.08% del Tinuvin[®] 326 (UV-326) en otro tipo de materiales [65].

Desde 2009, estos derivados del benzotriazol también forman parte de la lista HPV [61, 66]. Según datos publicados en revistas científicas de primer nivel, en el año 2006 se produjeron 549 toneladas del Tinuvin[®] 327 (UV-327) [67] y entre los años 2002 y 2005 se manufacturaron 320 toneladas del Tinuvin[®] 320 (UV-320) [68], siendo Japón uno de los principales fabricantes.

3.2. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

La estructura de los BUVSs se basa en la sustitución del átomo de hidrógeno unido al N₁ del 1H-benzotriazol por un grupo 2-hidroxifenilo, dando lugar a un 2-hidroxifenilbenzotriazol. A partir de ahí, surgen multitud de compuestos en función de los grupos sustituyentes presentes en las posiciones meta del anillo fenílico, presentando algunos de ellos un átomo de cloro en el anillo bencénico del benzotriazol, **Figura II.A.3**. En esta Tesis se han estudiado algunos de los BUVSs más extendidos: el UV-P, el UV-234, el UV-320, el UV-326, el UV-327, el Tinuvin[®] 328 (UV-

328), el Tinuvin® 329 (UV-329), el Tinuvin® 350 (UV-350) y el Norbloc® 7966 (UV-56). Las estructuras de estas sustancias se recogen en la **Figura II.A.3**.

Las propiedades físico-químicas de estos protectores UV se resumen en la **Tabla II.A.3**. A diferencia de los benzotriazoles, que son compuestos polares, sus derivados fenólicos son altamente lipofílicos ($\log K_{ow}$ 4-9) y por tanto, poco solubles en agua. Por otra parte, tienen propiedades ácidas, el pK_a del hidrógeno del grupo hidroxilo oscila entre 8 y 10, de manera que estos compuestos se encuentran en su forma neutra a valores de pH inferiores a 8. Al igual que los benzotriazoles, los 2-hidroxifenilbenzotriazoles son poco volátiles (presión de vapor 8.8×10^{-8} - 1.6×10^{-14} Torr).



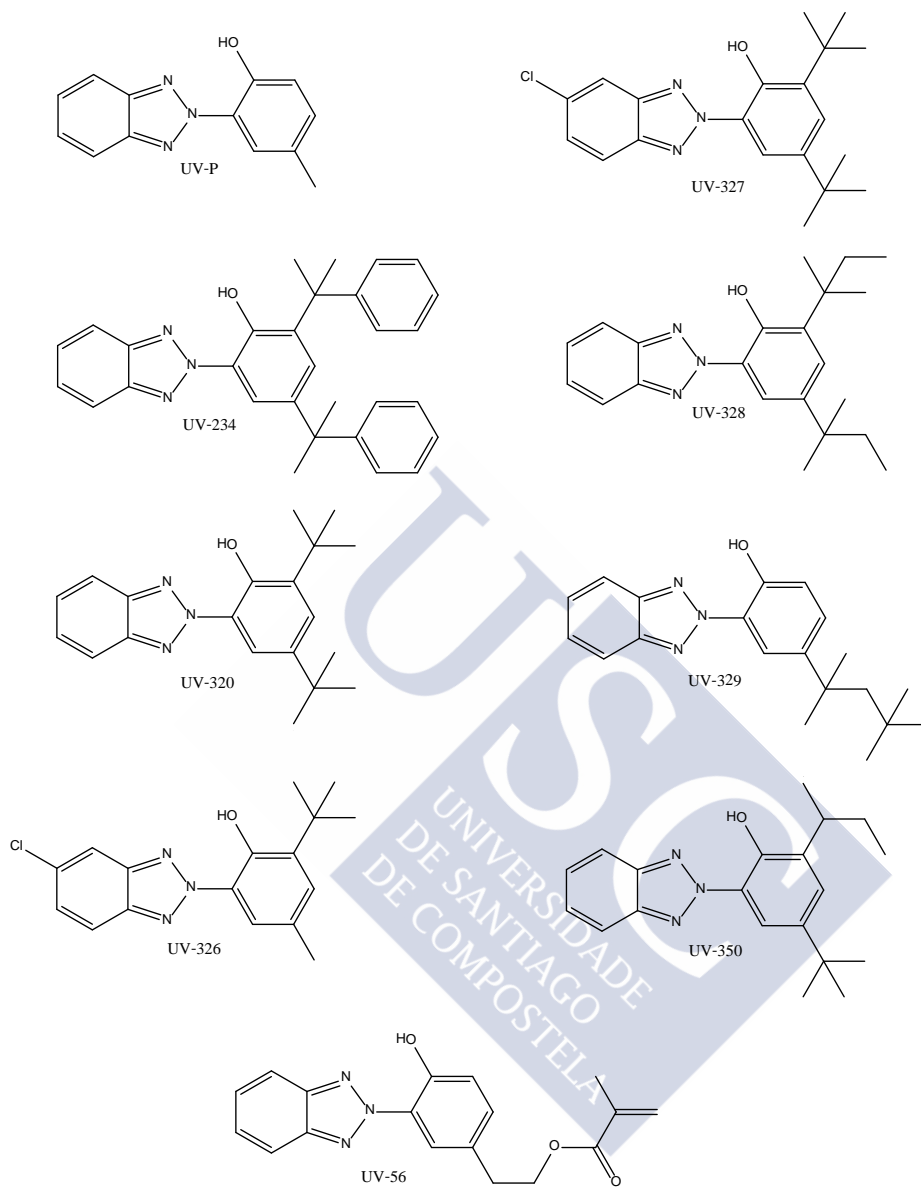


Figura II.A.3. Estructura de los BUVSs estudiados

Tabla II.A.3. Propiedades físico-químicas de los BUVs estudiados tomadas de la base de datos ChemSpider[26]

Compuesto	Abv	CAS	Fórmula	Peso molecular	log K _{ow}	pK _a	Presión de vapor* (Torr)	Solubilidad (g·L ⁻¹) (pH 7, 25 °C)
Tinuvin P	UV-P	2440-22-4	C ₁₃ H ₁₁ N ₃ O	225.25	4.3	8.2	8.8x10 ⁻⁸	1.8x10 ⁻²
Tinuvin 234	UV-234	70321-86-7	C ₃₀ H ₂₉ N ₃ O	447.58	7.7	9.6	1.6x10 ⁻¹⁴	1.0x10 ⁻⁶
Tinuvin 320	UV-320	3846-71-7	C ₂₀ H ₂₅ N ₃ O	323.43	6.8	9.4	1.7x10 ⁻⁸	6.8x10 ⁻⁴
Tinuvin 326	UV-326	3896-11-5	C ₁₇ H ₁₈ ClN ₃ O	315.81	6.8	9.3	4.2x10 ⁻⁹	3.5x10 ⁻⁴
Tinuvin 327	UV-327	3864-99-1	C ₂₀ H ₂₄ ClN ₃ O	357.88	7.5	9.2	2.0x10 ⁻⁹	1.5x10 ⁻⁴
Tinuvin 328	UV-328	25973-55-1	C ₂₂ H ₂₉ N ₃ O	351.49	7.9	8.8	2.0x10 ⁻⁹	1.7x10 ⁻⁴
Tinuvin 329	UV-329	3147-75-9	C ₂₀ H ₂₅ N ₃ O	323.43	6.2	8.1	1.6x10 ⁻⁹	3.0x10 ⁻⁴
Tinuvin 350	UV-350	36437-37-3	C ₂₀ H ₂₅ N ₃ O	323.43	6.3	8.3	5.2x10 ⁻⁹	5.5x10 ⁻⁴
Norbloc 7966	UV-56	96478-09-0	C ₁₈ H ₁₇ N ₃ O ₃	323.35	3.9	7.8	2.1x10 ⁻¹⁰	1.5x10 ⁻²

*Valores estimados con EPI suite [27]

3.3. TOXICIDAD Y DISTRIBUCIÓN EN EL MEDIO AMBIENTE

Toxicológicamente, no existen suficientes investigaciones acerca de los BUVSs como para determinar su peligrosidad. De momento, la EPA ha publicado un informe [60] en el que sostiene que la toxicidad de estos compuestos es baja y que no son carcinogénicos. En este estudio también se estima que las LC_{50} para humanos son muy altas (2000-10000 mg kg^{-1} de peso corporal). Además, otras investigaciones apuntan a que los Tinuvines no muestran actividad estrogénica [69]. Sin embargo, estos benzotriazoles sí que generan irritaciones en la piel y dermatitis cuando se establece contacto directo con ellos [70, 71]. Más recientemente se ha revelado que el Tinuvin® 320 es hepatotóxico y produce daños en el hígado [72].

Por otra parte, se trata de compuestos estables química y térmicamente, aunque pueden ser fotodegradados fácilmente, con $t_{1/2}$ estimados de ente 1 y 8 horas [60]. Sin embargo, se ha descrito su acumulación en los alrededores de las factorías donde se producen [73-75].

Además, dada su alta hidrofobicidad, los benzotriazoles fenólicos tienen una gran tendencia a acumularse en matrices sólidas ambientales. Este comportamiento ha sido demostrado en estudios llevados a cabo en zonas acuáticas, donde se ha encontrado la presencia de BUVSs en sedimentos [68, 74-78]. Las medidas realizadas en las STPs confirman esta situación: mientras los niveles en agua residual se sitúan en los $ng L^{-1}$ [79, 80], los niveles en lodos van desde los pocos $ng g^{-1}$ hasta los $\mu g g^{-1}$ [48, 81-83]. Las concentraciones medidas en estos últimos trabajos han sido 1167 $ng g^{-1}$ de media para UV-234, 50-1100 $ng g^{-1}$ para UV-326, 3.7-170 $ng g^{-1}$ para UV-327 y 57-1300 $ng g^{-1}$ para UV-328. Estos y otros niveles determinados en sedimentos fluviales y lodos procedentes de STPs se recogen en la **Tabla II.A.4**.

Tabla II.A.4. Niveles de BUVSs encontrados en muestras de sedimento y lodo

Compuesto	Muestra	País	Año	Concentración máxima (ng g ⁻¹)	Ref
UV-P	Sedimento Río Pawtuxet	RI USA	1980	800000	[76]
	Sedimento Río Pawtuxet	RI USA	2000	4300000	[74]
	Sedimento Río	Japón	2011	4.4	[77]
	Sedimento Río	España	2012	30	[78]
UV-234	Sedimento Río	Japón	2011	324	[77]
UV-320	Sedimento Río Omuta	Japón	2006	14	[68]
	Sedimento Río Chikugo	Japón	2007	0.8	[68]
	Sedimento Río Yabe	Japón	2007	0.8	[68]
	Sedimento Río Kikuchi	Japón	2007	1.2	[68]
	Sedimento Río Tojin	Japón	2007	1.1	[68]
	Sedimento Mar Kumamoto	Japón	2007	1	[68]
	Sedimento Río Midori	Japón	2007	0.3	[68]
	Sedimento Mar Shiranui	Japón	2007	0.3	[68]
	Sedimento Río Hikawa	Japón	2007	0.3	[68]
	Sedimento Río	España	2012	5.6	[78]
UV-326	Sedimento Río Pawtuxet	RI USA	2000	260000	[74]
	Sedimento Río Saginaw	China	2002	5.9	[82]
	Sedimento Río Omuta	Japón	2006	200	[68]
	Sedimento Río Chikugo	Japón	2007	1.8	[68]
	Sedimento Río Yabe	Japón	2007	1.5	[68]
	Sedimento Río Kikuchi	Japón	2007	3.3	[68]
	Sedimento Río Tojin	Japón	2007	2.6	[68]
	Sedimento Mar Kumamoto	Japón	2007	1.8	[68]
	Sedimento Río Midori	Japón	2007	5.4	[68]
	Sedimento Mar Shiranui	Japón	2007	4.8	[68]
	Sedimento Río Hikawa	Japón	2007	3.2	[68]
	Lodo STP	China	2009	136	[82]
	Sedimento Río Songhua	China	2009	2	[82]
	Lodo STP Adelaide	Australia	2011	50	[48]
	Sedimento Río	Japón	2011	45	[77]
Sedimento Río	España	2012	32	[78]	
UV-327	Sedimento Río Pawtuxet	RI USA	1980	400000	[76]
	Sedimento Río Pawtuxet	RI USA	2000	5200000	[74]
	Sedimento Río Saginaw	China	2002	1.9	[82]
	Sedimento Río Omuta	Japón	2006	190	[68]

A. SUSTANCIAS QUÍMICAS ESTUDIADAS

Tabla II.A.4 (continuación). Niveles de BUVS encontrados en muestras de sedimento y lodo

Compuesto	Muestra	País	Año	Concentración máxima (ng g ⁻¹)	Ref
UV-327	Sedimento Río Chikugo	Japón	2007	1.9	[68]
	Sedimento Río Yabe	Japón	2007	1.6	[68]
	Sedimento Río Kikuchi	Japón	2007	2.4	[68]
	Sedimento Río Tojin	Japón	2007	3.2	[68]
	Sedimento Mar Kumamoto	Japón	2007	2	[68]
	Sedimento Río Midori	Japón	2007	3.2	[68]
	Sedimento Mar Shiranui	Japón	2007	6.3	[68]
	Sedimento Río Hikawa	Japón	2007	1.6	[68]
	Lodo STP	China	2009	8.4	[82]
	Sedimento Río Songhua	China	2009	0.3	[82]
	Sedimento Efluente STP	Japón	2011	1	[77]
	Sedimento Río	Japón	2011	18	[77]
	Sedimento Río	España	2012	15	[78]
UV-328	Sedimento Río Pawtuxet	RI USA	1980	300000	[76]
	Sedimento Río Saginaw	China	2002	224	[82]
	Sedimento Río Omuta	Japón	2006	320	[68]
	Sedimento Río Chikugo	Japón	2007	6.3	[68]
	Sedimento Río Yabe	Japón	2007	4.5	[68]
	Sedimento Río Kikuchi	Japón	2007	5	[68]
	Sedimento Río Tojin	Japón	2007	8.1	[68]
	Sedimento Mar Kumamoto	Japón	2007	4.2	[68]
	Sedimento Río Midori	Japón	2007	11	[68]
	Sedimento Mar Shiranui	Japón	2007	3.8	[68]
	Sedimento Río Hikawa	Japón	2007	2.8	[68]
	Lodo STP	China	2009	5920	[82]
	Sedimento Río Songhua	China	2009	7.1	[82]
	Sedimento Efluente STP	Japón	2011	85	[77]
	Sedimento Río	Japón	2011	1735	[77]
UV-329	Sedimento Río	Japón	2011	7.4	[77]
	Lodo STP Adelaide	Australia	2011	123	[48]

Cuando los efluentes de las STPs cargados de BUVSs son descargados en el agua superficial, estos compuestos se extienden por el medio ambiente. Así, se han establecido correlaciones entre las concentraciones de UV-234, UV-326, UV-327 y UV-328 medidas en

efluentes de STPs y las medidas en los correspondientes ríos [77]; yendo estas últimas desde 1 ng L⁻¹, medido para UV-327, hasta los 4780 ng L⁻¹, medidos para UV-328 [77]. También se han encontrado trazas de estos compuestos en muestras de agua tomadas en el Océano Atlántico (Gran Canaria, España) [80]. No obstante, las industrias en las que se manufacturan BUVs son las principales responsables de gran parte de los niveles encontrados en algunos ríos, incluso años después del cierre de estas plantas [74].

Finalmente, también se ha descrito la acumulación de este tipo de benzotriazoles en animales marinos [67, 81, 84-86] y pájaros [68], confirmando, por tanto, la incorporación de estas sustancias a las cadenas tróficas. Los compuestos encontrados en animales en mayor número de ocasiones son el UV-P, el UV-327 y el UV-328. Asimismo, trazas de estos y otros BUVs han sido detectadas en atmósferas interiores [87].

Dadas las circunstancias descritas en los párrafos anteriores, el Estado Japonés decidió controlar la producción y el uso del UV-326 y del UV-350, y prohibió el uso del UV-320 [86], mientras que la Unión Europea, además de controlar el EHMC [16], reguló el UV-P, el UV-326, el UV-327 y el Tinuvin® 900 (UV-900), estableciendo límites de migración específica de 30 mg Kg⁻¹ para la suma de los tres primeros y de 1.5 mg Kg⁻¹ para el último, en materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos [88, 89].

4. FÁRMACOS ANTIMICÓTICOS

4.1. DEFINICIÓN Y USOS

Los fármacos antimicóticos constituyen un amplio grupo de sustancias diseñadas para combatir infecciones causadas por hongos. Los agentes antifúngicos más extendidos son el clotrimazol (CTZ), el ketoconazol (KTZ) y el miconazol (MCZ), que se aplican sobre la piel en forma de cremas, el climbazol (CBZ), que es un ingrediente de algunos champús recetados en casos de descamación, y el fluconazol (FCZ), que se administra oralmente y por vía intravenosa. La actividad de estos productos consiste en la inhibición de ciertas enzimas que intervienen en los procesos de reproducción de los hongos. Recientemente, estos compuestos han despertado el interés desde el punto de vista analítico y ecotoxicológico debido a su potencial impacto medioambiental [90], sus bajos índices de eliminación en las STPs y su posible bio-acumulación [91, 92].

4.2. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

A diferencia de las otras dos familias de ECs estudiadas en esta Tesis, inhibidores de corrosión y estabilizadores UV, que están basadas en el benzotriazol, los fármacos antimicóticos no tienen una estructura común, aunque la mayoría de ellos sí que contiene anillos azólicos, en algunos casos triazólicos y en otros imidazólicos, o grupos alilamina [93, 94]. En esta Tesis se han estudiado, además del CTZ, KTZ, MCZ, CBZ, que son imidazoles, y del FCZ, que es un triazol, el econazol (ECZ), imidazol, el etaconazol (ETZ), triazol, y la terbinafina (TRB), alilamina. Las estructuras de todos estos agentes antifúngicos se recogen en la **Figura II.A.4**.

Las propiedades físico-químicas de los fármacos antimicóticos seleccionados se resumen en la **Tabla II.A.5**. Todos ellos son lipofílicos, a excepción del FCZ que es polar ($\log K_{ow}$ 0.4). En cuanto a la solubilidad de estos compuestos, la mayor parte de ellos son insolubles o poco solubles en agua; sin embargo, el FCZ es muy soluble y el ETZ y el CBZ son moderadamente solubles. Por otro lado, se trata de sustancias de naturaleza básica, con valores de pK_a para el grupo más básico, situado en el anillo azólico, superiores a 2.6 en el caso de los triazoles (FCZ y ETZ), de manera que estas sustancias se encuentran en su forma neutra a valores de pH superiores a 3. Por su parte, los imidazoles son mucho más básicos con valores de pK_a comprendidos entre 5.7 (CBZ) y 6.9 (ECZ y KTZ) permaneciendo en forma neutra a pHs

superiores a 6 y 7, respectivamente. Además, el FCZ posee un hidrógeno ácido en el grupo hidroxilo, con un pK_a de 11.0, convirtiéndose, por tanto, en su forma aniónica a valores de pH superiores a este número. Al igual que los benzotriazoles y sus derivados fenólicos, los fármacos antimicóticos son poco volátiles (presión de vapor $5.8 \times 10^{-7} - 2.8 \times 10^{-14}$ Torr).

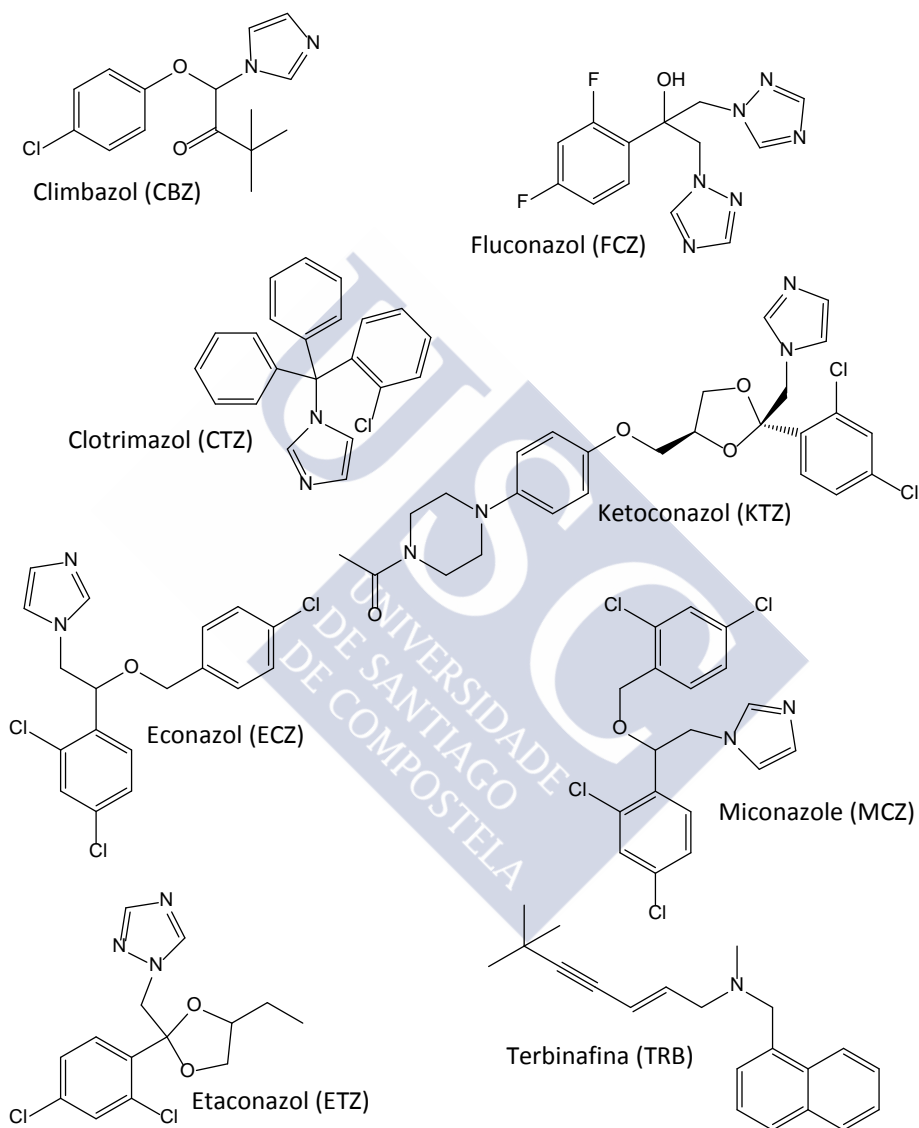


Figura II.A.4. Estructura de los fármacos antimicóticos estudiados

Tabla II.A.5. Propiedades físico-químicas de los fármacos antimicóticos estudiados tomadas de la base de datos ChemSpider[26]

Compuesto	Abv	CAS	Fórmula	Peso molecular	log K _{ow}	pK _a	Presión vapor* (Torr)	Solubilidad (g·L ⁻¹) (pH 7, 25 °C)
Climbazol	CBZ	38083-17-9	C ₁₅ H ₁₇ ClN ₂ O ₂	292.76	3.8	5.7	2.1 x 10 ⁻⁷	8.3
Clotrimazol	CTZ	23593-75-1	C ₂₂ H ₁₇ ClN ₂	344.84	4.1	6.1	5.4 x 10 ⁻⁹	0.030
Econazol	ECZ	27220-47-9	C ₁₈ H ₁₅ Cl ₃ N ₂ O	381.68	5.5	6.9	6.2 x 10 ⁻¹¹	0.060
Etaconazol	ETZ	60207-93-4	C ₁₄ H ₁₅ Cl ₂ N ₃ O ₂	328.19	3.6	2.9	5.2 x 10 ⁻⁹	22
Fluconazol	FCZ	86386-73-4	C ₁₃ H ₁₂ F ₂ N ₆ O	306.27	0.4	2.6 ^b 11.0 ^a	2.8 x 10 ⁻¹⁴	336
Ketoconazole	KTZ	65277-42-1	C ₂₆ H ₂₈ Cl ₂ N ₄ O ₄	531.43	4.3	6.9	1.4 x 10 ⁻²²	0.087
Miconazol	MCZ	22916-47-8	C ₁₈ H ₁₄ Cl ₄ N ₂ O	416.13	6.1	6.6	8.6 x 10 ⁻¹²	0.011
Terbinafine	TRB	91161-71-6	C ₂₁ H ₂₅ N	291.43	5.6	7.1	5.8 x 10 ⁻⁷	1.5

^a pK_a para el grupo más ácido^b pK_a para el grupo más básico

*Valores estimados con EPI suite [27]

4.3. TOXICIDAD Y DISTRIBUCIÓN EN EL MEDIO AMBIENTE

Como se ha mencionado anteriormente, la actividad de los fármacos antimicóticos se centra en la inhibición de ciertas enzimas, como la aromatasa, que son responsables de la diferenciación sexual de animales vertebrados durante estados larvarios y del balance de hormonas androgénicas y estrogénicas de mamíferos [94-96]. Por tanto, pueden actuar como disruptores endocrinos en los organismos acuáticos que están en contacto directo con ellos [97].

La mayor parte de los agentes antimicóticos se aplican directamente sobre la piel, por lo que los procesos de lavado de las zonas del cuerpo bajo tratamiento constituyen la principal fuente de estas sustancias en el sistema de aguas residuales urbano. Algunos, como el FCZ, se ingieren en preparados farmacéuticos y tras su excreción, de manera conjunta con sus metabolitos, son vertidos en el agua residual urbana [90, 98]. De este modo, estos productos llegan a las STPs, donde las aguas son procesadas con el objetivo de eliminar los compuestos peligrosos antes de descargar los efluentes en aguas superficiales. Los tratamientos convencionales aplicados en las STPs constan de dos etapas. En primer lugar, los aceites y las grasas son separados del agua en los clarificadores primarios. A continuación, el agua es transferida a través de dársenas de aireación, donde burbujas de aire y microorganismos son aplicados, hacia los clarificadores secundarios para que se produzca la degradación de la materia orgánica, a la vez que el lodo secundario, también conocido como biológico, sedimenta. El esquema de este proceso se representa en la **Figura II.A.5**.

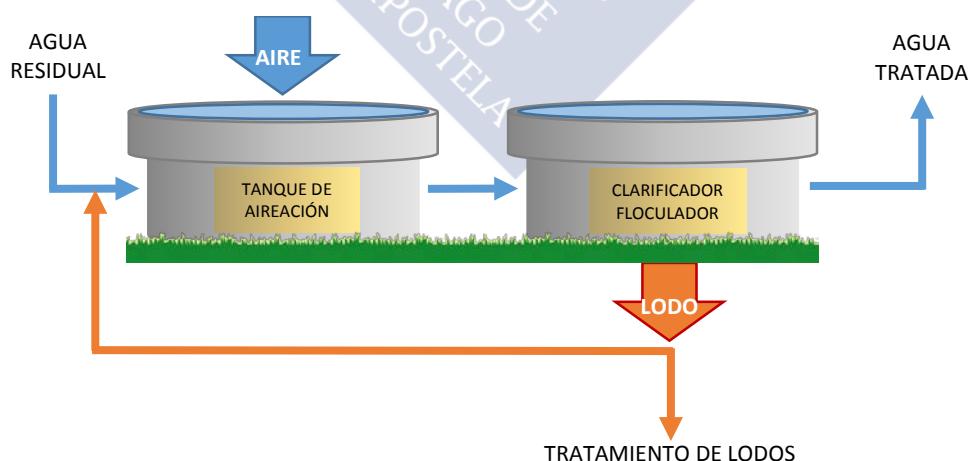


Figura II.A.5 Esquema del tratamiento convencional aplicado en una STP

De esta forma, los fármacos antimicóticos solubles que no son degradados completamente llegan a las aguas superficiales, mientras que los más lipofílicos pueden sedimentar con la materia particulada [99], pasando a formar parte de los lodos (primario y biológico) que, tras un tratamiento de estabilización, son enterrados, o bien, reutilizados como parte de preparados fertilizantes en agricultura, ya que contienen materia orgánica rica en nutrientes y aumentan la productividad del suelo [92]. Esto explica que el FCZ, que es el agente antimicótico estudiado más soluble en agua, haya sido detectado a niveles similares en los influentes ($34\text{-}109\text{ ng L}^{-1}$) y en los efluentes ($28\text{-}83\text{ ng L}^{-1}$) de las STPs, indicando la resistencia de este producto a la biodegradación [94], y llegando a medirse concentraciones de hasta 9 ng L^{-1} en agua superficial. Mientras que el CTZ, que es uno de los fármacos más lipofílicos y, por tanto, con mayor tendencia a adherirse a los sólidos en suspensión [100, 101], aparece prácticamente sólo en los influentes ($12\text{-}71\text{ ng L}^{-1}$), con concentraciones en los efluentes inferiores a 6 ng L^{-1} [94]. Éste y otros antimicóticos poco solubles como ECZ, KTZ y MCZ, también han sido encontrados en lodos de STPs a niveles alarmantemente altos, $190\text{-}2547\text{ ng g}^{-1}$, $54\text{-}153\text{ ng g}^{-1}$, $126\text{-}490\text{ ng g}^{-1}$ y $240\text{-}2069\text{ ng g}^{-1}$, respectivamente [102].

Este mismo efecto se observa si comparamos el CBZ, que es moderadamente soluble en agua, y el KTZ, que no lo es. Wick et al. [103] midieron las concentraciones de estos dos compuestos en el influente y el efluente de una STP, así como en muestras de agua superficial tomadas en el río Rin (Koblenz, Alemania) y en los lodos. Mientras el KTZ solamente estaba presente en el influente ($<90\text{ ng L}^{-1}$) y en el lodo (328 ng g^{-1}), el CBZ se encontraba en el influente ($475\text{-}1350\text{ ng L}^{-1}$), en el efluente ($312\text{-}443\text{ ng L}^{-1}$), en el agua superficial ($47\text{-}530\text{ ng L}^{-1}$) y también en el lodo (1160 ng g^{-1}).

Los trabajos de Huang et al. [104] también concuerdan con la hipótesis anterior. En sus investigaciones, cuantificaron cantidades elevadas de CTZ, KTZ y MCZ en los influentes de una STP (33 , 16 y 32 ng L^{-1} , respectivamente), cuya concentración en los efluentes era bastante menor (8 , 2 y 3 ng L^{-1} , respectivamente). La explicación de esta disminución drástica es que estas sustancias se encontraban presentes a concentraciones realmente altas en los lodos de la misma STP: $190\text{-}1442\text{ ng g}^{-1}$ para CTZ, $194\text{-}437\text{ ng g}^{-1}$ para KTZ y $238\text{-}1405\text{ ng g}^{-1}$ para MCZ. Este último compuesto también ha sido hallado a concentraciones similares (1100 ng g^{-1}) en muestras de lodo en una investigación paralela [105].

Por otra parte, algunos estudios preliminares apuntan a que los fármacos antimicóticos son también resistentes a los tratamientos terciarios de cloración y a los realizados mediante irradiación con luz UV, que se están incorporando gradualmente en algunas STPs [102, 106].

En la **Tabla II.A.6** se recogen las concentraciones máximas medidas en muestras de agua tomadas antes y después del tratamiento en STPs, así como en muestras de lodo recogidas en estas mismas STPs y en aguas superficiales.

Tabla II.A.6. Concentraciones máximas (ng L^{-1}) medidas en influente y efluente de STPs y en agua superficial y concentraciones máximas (ng g^{-1}) en lodo procedente de STPs

	Muestra	País	Año	Concentración máxima				Ref
				Influente STP (ng L^{-1})	Efluente STP (ng L^{-1})	Agua superficial (ng L^{-1})	Lodo STP (ng g^{-1})	
CBZ	STP Río Rin	Alemania	2008	1350	443	530	1160	[103]
	STP Horgen	Suiza	2007	12	n.d.	-	-	[94]
	STP Zürich	Suiza	2007	78	n.d.	-	-	[94]
	STP Männedorf	Suiza	2007	44	n.d.	-	-	[94]
	STP Küsnacht	Suiza	2007	25	<LOQ	-	-	[94]
	STP Meilen	Suiza	2007	42	5	-	-	[94]
CTZ	STP Wädenswil	Suiza	2007	39	<LOQ	-	-	[94]
	STP Thalwil	Suiza	2007	71	6	-	-	[94]
	STP Wetzikon	Suiza	2007	43	<LOQ	-	-	[94]
	STP Gossau	Suiza	2007	30	<LOQ	-	-	[94]
	STP Uster	Suiza	2007	31	<LOQ	-	-	[94]
	STP Cantón	China	2010	33	8	4	1442	[104]
	STP	China	2012	-	-	-	2547	[102]
ECZ	STP Cantón	China	2010	-	-	-	140	[104]
	STP	China	2012	-	-	-	153	[102]
	Lago Zürichsee	Suiza	2007	-	-	1	-	[94]
FCZ	Lago Sempachersee	Suiza	2007	-	-	0.5	-	[94]
	Lago Hallwilersee	Suiza	2007	-	-	1	-	[94]
	Lago Baldeggersee	Suiza	2007	-	-	1	-	[94]

A. SUSTANCIAS QUÍMICAS ESTUDIADAS

Tabla II.A.6 (continuación). Concentraciones máximas (ng L^{-1}) medidas en influente y efluente de STPs y en agua superficial y concentraciones máximas (ng g^{-1}) en lodo procedente de STPs

Muestra	País	Año	Concentración máxima				Ref
			Influente STP (ng L^{-1})	Efluente STP (ng L^{-1})	Agua superficial (ng L^{-1})	Lodo STP (ng g^{-1})	
Lago Pfäffikersee	Suiza	2007	-	-	3	-	[94]
Lago Greifensee	Suiza	2007	-	-	9	-	[94]
STP Horgen	Suiza	2007	34	28	-	-	[94]
STP Zürich	Suiza	2007	88	83	-	-	[94]
STP Männedorf	Suiza	2007	90	52	-	-	[94]
FCZ STP Küsnacht	Suiza	2007	61	48	-	-	[94]
STP Meilen	Suiza	2007	46	39	-	-	[94]
STP Wädenswil	Suiza	2007	39	63	-	-	[94]
STP Thalwil	Suiza	2007	109	35	-	-	[94]
STP Wetzikon	Suiza	2007	42	42	-	-	[94]
STP Gossau	Suiza	2007	32	36	-	-	[94]
STP Uster	Suiza	2007	54	67	-	-	[94]
STP Río Rin	Alemania	2008	90	-	-	328	[103]
KTZ STP Cantón	China	2010	16	2	1	437	[104]
STP	China	2012	-	-	-	490	[102]
STP Cantón	China	2010	32	3	2	1405	[104]
MCZ STP	USA	2010	-	-	-	1100	[105]
STP	China	2012	-	-	-	2069	[102]

5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] S.D. Richardson, *Analytical Chemistry* 79 (2007) 4295-4324.
- [2] S.D. Richardson, *Analytical Chemistry* 80 (2008) 4373-4402.
- [3] T.A. Ternes, *Water Research* 32 (1998) 3245-3260.
- [4] M.L. Richardson, J.M. Bowron, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 37 (1985) 1-12.
- [5] I.H. Rogers, I.K. Birtwell, G.M. Kruzynski, *Water Pollution Research Journal of Canada* 21 (1986) 187-204.
- [6] J.E. Drewes, T. Heberer, T. Rauch, K. Reddersen, *Ground Water Monitoring and Remediation* 23 (2003) 64-72.
- [7] C.A. Kinney, E.T. Furlong, S.L. Werner, J.D. Cahill, *Environmental Toxicology and Chemistry* 25 (2006) 317-326.
- [8] E.D. Jörg, S.S. Laurence, *Concerns about Pharmaceuticals in Water Reuse, Groundwater Recharge, and Animal Waste*, in: *Pharmaceuticals and Care Products in the Environment*, American Chemical Society, 2001.
- [9] P. Westerhoff, Y. Yoon, S. Snyder, E. Wert, *Environmental Science and Technology* 39 (2005) 6649-6663.
- [10] *Drinking Water Contaminant Candidate List (CCL) and Regulatory Determination*. U.S. Environmental Protection Agency, available at: <http://www2.epa.gov/ccl>, accessed on: June 2015.
- [11] *Safe Drinking Water Act (SDWA)*, U.S. Environmental Protection Agency, available at: <http://water.epa.gov/lawsregs/rulesregs/sdwa/index.cfm>, accessed on: June 2015.
- [12] *Water Framework Directive. Directive 2000/60/EC*, EU, European Parliament and Council, available at: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32000L0060>, accessed on: June 2015.
- [13] S. Jobling, M. Nolan, C.R. Tyler, G. Brighty, J.P. Sumpter, *Environmental Science and Technology* 32 (1998) 2498-2506.
- [14] R.J. Kavanagh, G.C. Balch, Y. Kiparissis, A.J. Niimi, J. Sherry, C. Tinson, C.D. Metcalfe, *Environmental Health Perspectives* 112 (2004) 898-902.
- [15] M. Stuart, D. Lapworth, E. Crane, A. Hart, *Science of The Total Environment* 416 (2012) 1-21.

- [16] Watch List of Substances for Union-wide Monitoring. Decision 2015/495, amending Directive 200/60/EC, EU, European Commission, available at: http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=uriserv:OJ.L_.2015.078.01.0040.01.ENG, accessed on: July 2015.
- [17] H.B. Madsen, *Studies in Conservation* 12 (1967) 163-167.
- [18] C. Sease, *Studies in Conservation* 23 (1978) 76-85.
- [19] S.D. Richardson, T.A. Ternes, *Analytical Chemistry* 83 (2011) 4614-4648.
- [20] S.D. Richardson, *Analytical Chemistry* 84 (2012) 747-778.
- [21] W. Vetter, J. Lorenz, *Environmental Science and Pollution Research* 20 (2013) 4435-4440.
- [22] High Production Volume (HPV) Challenge. U.S. Environmental Protection Agency, available at: <http://www.epa.gov/hpv/>, accessed on: June 2015.
- [23] K.S. Betts, *Environmental Science and Technology* 33 (1999) 210A-212A.
- [24] J.S. Cornell, D.A. Pillard, M.T. Hernandez, *Environmental Toxicology and Chemistry* 19 (2000) 1465-1472.
- [25] D.A. Cancilla, J.C. Baird, S.W. Geis, S.R. Corsi, *Environmental Toxicology and Chemistry* 22 (2003) 134-140.
- [26] ChemSpider. UK Royal Society of Chemistry, available at: <http://www.chemspider.com/>, accessed on: June 2015.
- [27] Estimation Program Interface (EPI) Suite. U.S. Environmental Protection Agency, available at: <http://www.epa.gov/opptintr/exposure/pubs/episuite.htm>, accessed on: June 2015.
- [28] S. Castro, L.C. Davis, L.E. Erickson, *International Journal of Phytoremediation* 5 (2003) 245-265.
- [29] 1,2,3-Benzotriazole, publication no. 2000/14OSH., Health Council of the Netherlands: Dutch Expert Committee on Occupational Standards, The Hague, 2000.
- [30] D.A. Cancilla, A. Holtkamp, L. Matassa, X. Fang, *Environmental Toxicology and Chemistry* 16 (1997) 430-434.
- [31] C.A. Harris, E.J. Routledge, C. Schaffner, J.V. Brian, W. Giger, J.P. Sumpter, *Environmental Toxicology and Chemistry* 26 (2007) 2367-2372.
- [32] H. Tangtian, L. Bo, L. Wenhua, P.K.S. Shin, R.S.S. Wu, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 80 (2012) 327-332.

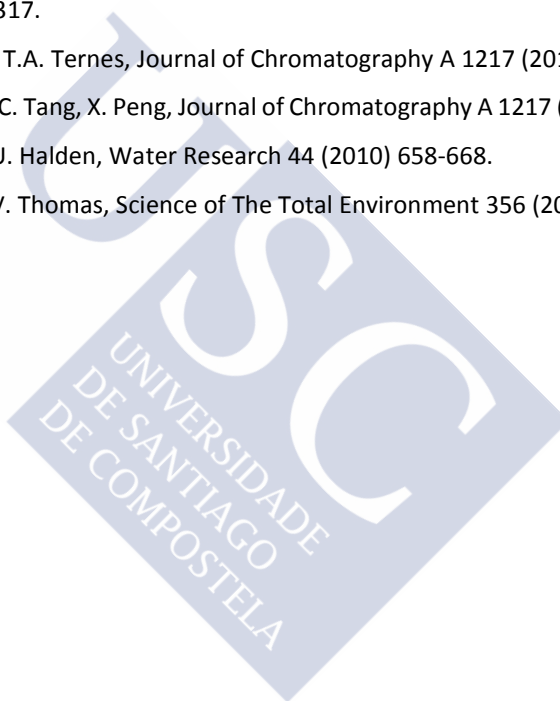
- [33] F.G. Davis, S. Erdal, L. Williams, D. Bigner, *International Journal of Occupational and Environmental Health* 12 (2006) 16-23.
- [34] E. Kadar, S. Dashfield, T. Hutchinson, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396 (2010) 641-647.
- [35] Y.-S. Liu, G.-G. Ying, A. Shareef, R.S. Kookana, *Journal of Contaminant Hydrology* 151 (2013) 131-139.
- [36] S.R. Corsi, D.H. Zitomer, J.A. Field, D.A. Cancilla, *Environmental Science and Technology* 37 (2003) 4031-4037.
- [37] E. Jover, V. Matamoros, J.M. Bayona, *Journal of Chromatography A* 1216 (2009) 4013-4019.
- [38] I. Carpinteiro, B. Abuin, M. Ramil, I. Rodríguez, R. Cela, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 402 (2012) 2471-2478.
- [39] S. Weiss, T. Reemtsma, *Analytical Chemistry* 77 (2005) 7415-7420.
- [40] S. Weiss, J. Jakobs, T. Reemtsma, *Environmental Science and Technology* 40 (2006) 7193-7199.
- [41] T. Reemtsma, S. Weiss, J. Mueller, M. Petrovic, S. González, D. Barceló, F. Ventura, T.P. Knepper, *Environmental Science and Technology* 40 (2006) 5451-5458.
- [42] W. Giger, C. Schaffner, H.P. Kohler, *Environmental Science and Technology* 40 (2006) 7186-7192.
- [43] R. Loos, B.M. Gawlik, G. Locoro, E. Rimaviciute, S. Contini, G. Bidoglio, *Environmental Pollution* 157 (2009) 561-568.
- [44] K. Nödler, T. Licha, K. Bester, M. Sauter, *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 6511-6521.
- [45] H. Wolschke, Z. Xie, A. Möller, R. Sturm, R. Ebinghaus, *Water Research* 45 (2011) 6259-6266.
- [46] G. Breedveld, R. Roseth, M. Sparrevik, T. Hartnik, L. Hem, *Water, Air and Soil Pollution: Focus* 3 (2003) 91-101.
- [47] R. Loos, G. Locoro, S. Comero, S. Contini, D. Schwesig, F. Werres, P. Balsaa, O. Gans, S. Weiss, L. Blaha, M. Bolchi, B.M. Gawlik, *Water Research* 44 (2010) 4115-4126.
- [48] Y.S. Liu, G.G. Ying, A. Shareef, R.S. Kookana, *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 5328-5335.

- [49] H. Janna, M.D. Scrimshaw, R.J. Williams, J. Churchley, J.P. Sumpter, *Environmental Science and Technology* 45 (2011) 3858-3864.
- [50] Z. Zhang, H. Yang, G. Wu, Z. Li, T. Song, X.Q. Li, *European Journal of Medicinal Chemistry* 46 (2011) 3909-3916.
- [51] L. Wang, A.G. Asimakopoulos, H.B. Moon, H. Nakata, K. Kannan, *Environmental Science and Technology* 47 (2013) 4752-4759.
- [52] A.G. Asimakopoulos, A.A. Bletsou, Q. Wu, N.S. Thomaidis, K. Kannan, *Analytical Chemistry* 85 (2013) 441-448.
- [53] D.A. Cancilla, J. Martinez, G.C. van Aggelen, *Environmental Science and Technology* 32 (1998) 3834-3835.
- [54] D. Voutsas, P. Hartmann, C. Schaffner, W. Giger, *Environmental Science and Pollution Research International* 13 (2006) 333-341.
- [55] J.A. van Leerdam, A.C. Hogenboom, M.M.E. van der Kooij, P. de Voogt, *International Journal of Mass Spectrometry* 282 (2009) 99-107.
- [56] M.T. Pena, X. Vecino-Bello, M.C. Casais, M.C. Mejuto, R. Cela, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 402 (2012) 1679-1695.
- [57] J.C. Crawford, *Progress in Polymer Science* 24 (1999) 7-43.
- [58] Á. Garrido-López, M.T. Tena, *Journal of Chromatography A* 1099 (2005) 75-83.
- [59] M. Monteiro, C. Nerín, F.G.R. Reyes, *Packaging Technology and Science* 12 (1999) 241-248.
- [60] Screening-level Hazard Characterization Sponsored Chemicals: Phenolic Benzotriazoles Category, U.S. Environmental Protection Agency, 2009.
- [61] High production volume (HPV) challenge program. Data summary and test plan for phenolic benzotriazoles, U.S. Environmental Protection Agency, 2001.
- [62] M. Himmelsbach, W. Buchberger, E. Reingruber, *Polymer Degradation and Stability* 94 (2009) 1213-1219.
- [63] S.H. Smith, L.T. Taylor, *Chromatographia* 56 (2002) 165-169.
- [64] M.C. Gennaro, V. Gianotti, F. Alberi, S. Angelino, M. Scagliotti, *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 22 (1999) 2689-2700.
- [65] S. Reiter, W. Buchberger, C. Klampfl, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 400 (2011) 2317-2322.

- [66] High production volume (HPV) chemical hazard characterizations, U.S. Environmental Protection Agency, available at: http://iaspub.epa.gov/opthpv/hpv_hc_characterization.get_report?doctype=2, accessed on: June 2015.
- [67] J.-W. Kim, K.-H. Chang, T. Isobe, S. Tanabe, *The Journal of Toxicological Sciences* 36 (2011) 247-251.
- [68] H. Nakata, S. Murata, J. Filatreau, *Environmental Science and Technology* 43 (2009) 6920-6926.
- [69] Y. Kawamura, Y. Ogawa, T. Nishimura, Y. Kikuchi, J.-i. Nishikawa, T. Nishihara, K. Tanamoto, *Journal of Health Science* 49 (2003) 205-212.
- [70] T. Yamano, M. Shimizu, T. Noda, *Journal of Health Science* 47 (2001) 123-128.
- [71] B. Niklasson, B. Bjorkner, *Contact Dermatitis* 21 (1989) 330-334.
- [72] M. Hirata-Koizumi, T. Matsuyama, T. Imai, A. Hirose, E. Kamata, M. Ema, *Congenital Anomalies* 49 (2009) 247-252.
- [73] J.S. Latimer, J.G. Quinn, *Environmental Science and Technology* 30 (1996) 623-633.
- [74] C.M. Reddy, J.G. Quinn, J.W. King, *Environmental Science and Technology* 34 (2000) 973-979.
- [75] P.C. Hartmann, J.G. Quinn, R.W. Cairns, J.W. King, *Marine Pollution Bulletin* 50 (2005) 388-395.
- [76] V. López-Ávila, R.A. Hites, *Environmental Science and Technology* 14 (1980) 1382-1390.
- [77] Y. Kameda, K. Kimura, M. Miyazaki, *Environmental Pollution* 159 (2011) 1570-1576.
- [78] I. Carpinteiro, B. Abuín, M. Ramil, I. Rodríguez, R. Cela, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 402 (2012) 519-527.
- [79] I. Carpinteiro, B. Abuín, I. Rodríguez, R. Cela, M. Ramil, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397 (2010) 829-839.
- [80] S. Montesdeoca-Esponda, Z. Sosa-Ferrera, J.J. Santana-Rodríguez, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 403 (2012) 867-876.
- [81] H. Nakata, R. Shinohara, *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry* 4 (2010) 51-59.
- [82] Z. Zhang, N. Ren, Y.-F. Li, T. Kunisue, D. Gao, K. Kannan, *Environmental Science and Technology* 45 (2011) 3909-3916.

- [83] T. Ruan, R. Liu, Q. Fu, T. Wang, Y. Wang, S. Song, P. Wang, M. Teng, G. Jiang, *Environmental Science and Technology* 46 (2012) 2071-2079.
- [84] J.-W. Kim, T. Isobe, B.R. Ramaswamy, K.-H. Chang, A. Amano, T.M. Miller, F.P. Siringan, S. Tanabe, *Chemosphere* 85 (2011) 751-758.
- [85] J.-W. Kim, B.R. Ramaswamy, K.-H. Chang, T. Isobe, S. Tanabe, *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 3511-3520.
- [86] H. Nakata, R.-i. Shinohara, S. Murata, M. Watanabe, *Journal of Environmental Monitoring* 12 (2010) 2088-2092.
- [87] I. Carpinteiro, B. Abuin, I. Rodriguez, M. Ramil, R. Cela, *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 3729-3735.
- [88] Reglamento (UE) 2015/174 de la Comisión Europea, del 5 de febrero de 2015, por el que se modifica y corrige el Reglamento (UE) 10/2011, sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos, Diario Oficial de la Unión Europea L30/2-9 de 06/02/2015.
- [89] Reglamento (UE) 10/2011 de la Comisión Europea, del 14 de enero de 2011, sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos, Diario Oficial de la Unión Europea L12/1-89 de 15/01/2011.
- [90] Q. Sui, B. Wang, W. Zhao, J. Huang, G. Yu, S. Deng, Z. Qiu, S. Lu, *Chemosphere* 89 (2012) 280-286.
- [91] A.I. García-Valcárcel, J.L. Tadeo, *Journal of Separation Science* 34 (2011) 1228-1235.
- [92] Z.-F. Chen, G.-G. Ying, Y.-B. Ma, H.-J. Lai, F. Chen, C.-G. Pan, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61 (2013) 6198-6206.
- [93] R.H. Lindberg, J. Fick, M. Tysklind, *Water Research* 44 (2010) 649-657.
- [94] M. Kahle, I.J. Buerge, A. Hauser, M.D. Muller, T. Poiger, *Environmental Science and Technology* 42 (2008) 7193-7200.
- [95] J.A. Zarn, B.J. Brüsweiler, J.R. Schlatter, *Environmental Health Perspectives* 111 (2003) 255-261.
- [96] E.R. Trösken, K. Scholz, R.W. Lutz, W. Volkel, J.A. Zarn, W.K. Lutz, *Endocrine Research* 30 (2004) 387-394.
- [97] I. Gyllenhammar, H. Eriksson, A. Söderqvist, R.H. Lindberg, J. Fick, C. Berg, *Aquatic Toxicology* 91 (2009) 102-109.

- [98] F. Heeb, H. Singer, B. Pernet-Coudrier, W. Qi, H. Liu, P. Longrée, B. Müller, M. Berg, *Environmental Science and Technology* 46 (2012) 8680-8688.
- [99] M. Peschka, P. Roberts, T. Knepper, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389 (2007) 959-968.
- [100] M. Hörsing, A. Ledin, R. Grabic, J. Fick, M. Tysklind, J.I.C. Jansen, H.R. Andersen, *Water Research* 45 (2011) 4470-4482.
- [101] Z.-F. Chen, G.-G. Ying, Y.-B. Ma, H.-J. Lai, F. Chen, C.-G. Pan, *Science of The Total Environment* 452-453 (2013) 377-383.
- [102] X. Peng, Q. Huang, K. Zhang, Y. Yu, Z. Wang, C. Wang, *Science of The Total Environment* 426 (2012) 311-317.
- [103] A. Wick, G. Fink, T.A. Ternes, *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 2088-2103.
- [104] Q. Huang, Y. Yu, C. Tang, X. Peng, *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 3481-3488.
- [105] K. McClellan, R.U. Halden, *Water Research* 44 (2010) 658-668.
- [106] P.H. Roberts, K.V. Thomas, *Science of The Total Environment* 356 (2006) 143-153.





II. B. PREPARACIÓN DE MUESTRA



La mayor parte de las técnicas instrumentales de análisis implican la introducción de los compuestos a analizar en fase líquida. Además, el análisis de compuestos orgánicos a nivel sub-ppb requiere la aplicación de una etapa previa al análisis en la que el nivel de concentración de los analitos aumenta de forma controlada, a la vez que se eliminan las interferencias. Por tanto, la preparación de muestra es una de las etapas más importantes dentro del proceso analítico, incluso cuando se trata de matrices líquidas.

En esta Tesis Doctoral se han optimizado metodologías de preparación de muestra basadas en extracción en fase sólida, microextracción en fase sólida, microextracción líquido-líquido dispersiva y dispersión de matriz en fase sólida para estudios de determinación, distribución y transformación de contaminantes emergentes azólicos en muestras de agua y lodos procedentes de STPs. En esta sección se definen los fundamentos de estas metodologías y se hace una revisión bibliográfica de su aplicación a las sustancias estudiadas.



1. MUESTRAS LÍQUIDAS

Las técnicas para la preparación de muestras líquidas han evolucionado sustancialmente desde que se empezó a utilizar la extracción líquido-líquido hasta la aplicación de las modernas técnicas de microextracción, que han permitido disminuir en gran medida la manipulación de la muestra y la utilización de disolventes y otro material de laboratorio, haciéndolas más rápidas a la vez que mucho más económicas. Sin embargo, la extracción en fase sólida continua siendo la metodología utilizada por antonomasia, principalmente para la preparación de muestras de agua.

1.1. EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO

La extracción líquido-líquido (*liquid-liquid extraction*, LLE) es la técnica más tradicional para extraer compuestos orgánicos de matrices acuosas. Ésta era la metodología más utilizada para preparar este tipo de muestras hasta la aparición de la extracción en fase sólida (SPE).

Consiste en poner en contacto una fase acuosa (la muestra) y otra orgánica (el disolvente extractante) inmiscibles entre sí, y aprovechar la diferente solubilidad del analito en cada una de ellas para transferirlo de la muestra al extractante. Por tanto, la eficacia de esta metodología viene dada por el coeficiente de reparto k_D , que se define como $[A]_o/[A]_a$, donde $[A]_o$ y $[A]_a$ son las concentraciones del analito en la fase orgánica y en la fase acuosa, respectivamente. En función del disolvente empleado, el pH de la muestra y la fuerza iónica de la misma, la eficacia de la extracción será mejor o peor [1].

Los principales motivos por los que la LLE fue sustituida por la SPE son su bajo poder concentrador y el gran consumo de disolventes orgánicos, así como la elevada manipulación de la muestra que conlleva.

Cancilla et al. [2] aplicaron LLE para extraer BTri, 5-TTri y XTri de muestras de agua de un río cercano a uno de los principales aeropuertos de América del Norte. Para ello, ejecutaron 3 extracciones consecutivas de 25 mL de muestra con 10 mL de cloruro de metileno y concentraron el extracto hasta un volumen final de 1 mL. Se desconocen las recuperaciones obtenidas.

1.2. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

La extracción en fase sólida (*solid-phase extraction*, SPE) se ha convertido en la metodología estándar para la preparación de muestras líquidas, principalmente muestras de agua. Surgió en los años 70 presentando una serie de ventajas respecto a la anteriormente descrita LLE, tales como un importante aumento del factor de concentración, reducción del volumen de disolventes orgánicos requeridos y disminución de los efectos negativos derivados de una excesiva manipulación de la muestra [3].

El principio de la SPE es la diferente adsorción de los analitos en una determinada fase sólida y la capacidad de ser eluidos de la misma mediante la aplicación de disolventes. De esta manera, se pueden alcanzar factores de concentración relativamente grandes y, si se escogen cuidadosamente los adsorbentes y disolventes utilizados, una gran selectividad en el aislamiento de los compuestos de interés.

El proceso de separación por SPE puede ser entendido de una manera similar al de la cromatografía de líquidos. En ambos casos, los compuestos son retenidos en mayor o menor medida por una fase sólida (fase estacionaria) en función de la naturaleza de la misma y de los disolventes utilizados (fase móvil) para separar los compuestos presentes en una mezcla. De hecho, los primeros dispositivos comerciales de SPE que aparecieron consistían en precolumnas de acero que contenían el adsorbente y se colocaban antes de la columna analítica de cromatografía de líquidos. Posteriormente, estas columnas *on-line* fueron sustituidas por formatos *off-line* desechables como los discos, y los cartuchos. En los primeros, el proceso se asemeja a la filtración, pues el adsorbente se encuentra en el interior de un disco de politetrafluoroetileno (Teflón) o de fibra de vidrio y la muestra se hace pasar a través de él. En el caso de los cartuchos, el material adsorbente se encuentra dentro de un tubo, a través del que se hace pasar la muestra. La aparición del formato jeringa con el terminal *Luer* convirtió este tipo de dispositivo en el más extendido debido a la facilidad para su operación.

1.2.1. Etapas

En general, la SPE consta de las siguientes etapas, que se describen gráficamente en la **Figura II.B.1** [1]:

- Acondicionamiento de la fase sólida. Se lava el adsorbente con los disolventes adecuados para eliminar interferencias y solvatar los grupos funcionales, haciendo que su interacción con los elementos de la matriz sea más eficaz. Normalmente se aplican los disolventes utilizados en la elución de los analitos y, en el caso de muestras acuosas, agua ultrapura. Este paso es obligatorio en el caso de utilizar adsorbentes basados en sílice.
- Paso de la muestra. Se hace pasar la muestra a través de la fase sólida, de manera que los analitos se queden anclados al adsorbente. La velocidad del paso de la muestra no debe ser demasiado alta, pues el tiempo de contacto de los analitos con la fase sólida tiene que ser suficiente para poder establecer las interacciones adsorbente-analito.
- Lavado. Esta etapa, que es opcional, consiste en el paso de un disolvente a través del material adsorbente con la intención de eluir compuestos que no son de interés con el objetivo de eliminar interferencias y reducir la complejidad del extracto final.
- Secado. Se seca la fase sólida por medio de vacío o aplicando corriente de nitrógeno con el fin de eliminar los restos de muestra o de disolvente de lavado y, de esta forma, permitir la posterior elución de los analitos con cualquier disolvente.
- Elución de los analitos. Finalmente, el disolvente escogido es aplicado a través del adsorbente, rompiendo la interacción existente entre los compuestos de interés y la fase sólida. Si se escoge cuidadosamente este disolvente se puede conseguir la elución selectiva de los analitos mientras las interferencias permanecen ancladas al material adsorbente.

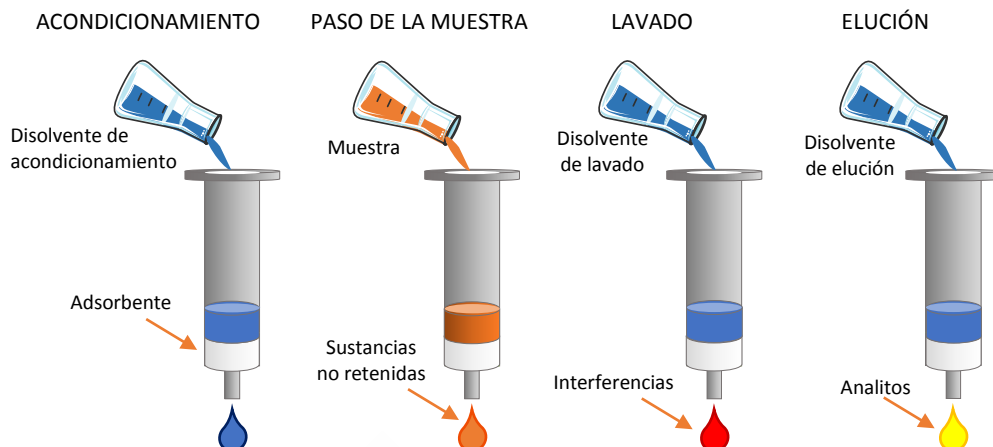


Figura II.B.1 Etapas del procedimiento de extracción en fase sólida

1.2.2. Materiales adsorbentes

Junto al disolvente empleado para la elución de los analitos, el adsorbente es el principal responsable de una buena eficacia en la extracción mediante SPE. Por ello, debe elegirse un material que pueda establecer buenas interacciones con los analitos. Clásicamente estos materiales estaban basados en óxidos inorgánicos, principalmente sílice, que pueden estar enlazados a diferentes grupos funcionales según el tipo de interacción que se pretenda establecer [1]. Más recientemente se comenzó a sustituir la base de sílice por una base polimérica. También se utiliza carbón grafitizado, materiales de acceso restringido (RAM) y otros adsorbentes más selectivos como los adsorbentes de afinidad o los polímeros impresos molecularmente (MIP) [4].

- Óxidos inorgánicos. Los más utilizados son la sílice, la alúmina, el silicato de magnesio (Florisil), y la tierra de diatomeas. Se trata de materiales polares, por lo que son útiles a la hora de extraer compuestos polares de muestras orgánicas, mediante interacciones dipolares y puentes de hidrógeno. Por este motivo, también pueden ser aplicados para eliminar interferencias presentes en extractos de muestras que ya han sido procesadas en una etapa de limpieza o *clean-up* posterior a la extracción.
- Sílices enlazadas. Consisten en cadenas de sílice que forman enlaces silil-éter con diferentes grupos funcionales. Según el grupo funcional, pueden establecerse los siguientes tipos de interacciones [5]:

- Fase normal. Son interacciones polares tipo dipolo-dipolo o puente de hidrógeno. De esta manera se extraen compuestos que son más polares que la matriz en la que se encuentran. Un ejemplo de este tipo de fase es la cianopropilsilano.
- Fase reversa. Se basa en interacciones de Van der Waals, extrayéndose compuestos menos polares que la matriz. Por ello, este tipo de materiales se utilizan principalmente para extraer compuestos orgánicos de muestras de agua. Los grupos más utilizados son el octilsilano (C8) y el octadecilsilano (C18).
- Intercambio iónico. Se establecen interacciones electrostáticas. Para ello, se funcionalizan las sílices con grupos iónicos y se extraen iones de la carga opuesta. Los grupos intercambiadores catiónicos más utilizados son el sulfonato, contenido en materiales como el (bencenosulfonil) propilsilano (SCX) o el (sulfonil) propilsilano (PRS), que genera interacciones fuertes, y el carboxilato, presente en materiales como el (carboxi) metilsilano (CBA), que dan lugar a interacciones más débiles. Por otro lado, los intercambiadores aniónicos fuertes más utilizados son las aminas cuaternarias, como las incluidas en el (trimetilamino) propilsilano (SAX), y los débiles las aminas secundarias, presentes en fases como la (dietilamino) propilsilano (DBA).
- Adsorbentes poliméricos. A diferencia de las sílices enlazadas, la estructura de estos adsorbentes se basa en polímeros. El más utilizado es el poliestireno-divinilbenceno (PS-DVB), que cuenta con una gran superficie específica de hasta $800 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$. La principal ventaja que presentan este tipo de materiales frente a las sílices enlazadas es que son estables en un rango de pH más amplio, mejoran la retención de compuestos polares y evitan la presencia de interferencias silanólicas en los extractos.

A pesar de estas ventajas, el gran auge de la SPE con materiales poliméricos no llegó hasta que Waters Corporation puso en el mercado el divinilbenceno-N-vinilpirrolidona (DVB-VP). El gran avance que presenta este polímero es que permite la retención tanto de compuestos polares como apolares presentes en muestras acuosas, haciéndolo útil para una cantidad innumerable de problemas analíticos. Por este motivo, este material, más conocido como balance hidrofílico lipofílico (*hydrophilic lipophilic balance*, HLB), se ha

convertido en el referente para extracciones de compuestos orgánicos de muestras de agua y es, a día de hoy, el adsorbente más utilizado en SPE [6].

Posteriormente, basándose en el HLB aparecieron los adsorbentes de modo mixto, que permiten la retención por fase reversa e intercambio iónico simultáneamente. Estos materiales son fruto de la funcionalización del DVB-VP con grupos cambiadores catiónicos fuertes como el sulfonato, MCX (*mixed-mode cation exchange*), débiles como el carboxilato, WCX (*mixed-mode weak cation exchange*), y con grupos cambiadores aniónicos fuertes como la amina cuaternaria, MAX (*mixed-mode anion exchange*), y débiles como la amina secundaria, WAX (*mixed-mode weak anion exchange*).

- Carbón grafitizado. Es un adsorbente no específico que extrae compuestos orgánicos polares mediante interacciones hidrofóbicas y π - π . Muchas veces, este tipo de interacciones son tan intensas que resulta imposible eluir los analitos. Este material también tiene cierto carácter de cambiador aniónico.
- Materiales de acceso restringido (*restricted access material*, RAM). Hay dos características que permiten la retención de los analitos en estas fases sólidas: la primera es el tamaño del poro del material, sólo las moléculas inferiores a un determinado tamaño pueden penetrar en ellos, y la segunda es la afinidad por la fase que se encuentra ligada en el interior de estos poros. La gran ventaja que tienen este tipo de adsorbentes es la eliminación de interferencias importantes, como los ácidos húmicos, en muestras de agua residual o las proteínas en el plasma [7].
- Adsorbentes de afinidad. En estos adsorbentes, los analitos son retenidos por interacción con anticuerpos, hormonas o enzimas que están anclados a una fase sólida. Destacan los inmunoabsorbentes, cuyo mecanismo de retención se basa en los sistemas de reconocimiento natural antígeno-anticuerpo. Esto les confiere una alta selectividad. El principal inconveniente es que sólo están disponibles comercialmente para un número muy reducido de analitos. Los primeros que aparecieron fueron los correspondientes a micotoxinas, herbicidas fenilureas e hidrocarburos policíclicos aromáticos [4].
- Polímeros impresos molecularmente (*molecular imprinted polymer*, MIP). Al igual que en el caso de los inmunoabsorbentes, se trata de polímeros que reconocen la estructura

molecular del analito, por lo que tienen una selectividad muy alta. Para su fabricación se utilizan la molécula de analito como plantilla y se produce la polimerización sobre ella. Una vez la plantilla se separa del adsorbente, deja un sitio vacante donde se puede retener otra molécula idéntica. Comparados con los inmunoabsorbentes, son más sencillos de preparar, con el consecuente ahorro económico, además de ser más reproducibles y duraderos [8, 9].

1.2.3. Aplicaciones de SPE a la extracción de benzotriazoles en muestras de agua

La **Tabla II.B.1** resume las principales aplicaciones de SPE a la extracción de benzotriazoles en muestras de agua. Como se puede observar, los adsorbentes tipo HLB, como el Oasis® HLB [10-14] o el Strata® X [15, 16] son los preferidos para este tipo de extracciones. En muchas de estas aplicaciones se acidifican las muestras antes de proceder a su extracción, ajustando el pH a valores de entre 2.5 y 3, **Tabla II.B.1**.

Carpinteiro et al. [17] compararon la extracción del BTri, TTri, XTri y 5-CIBTri, además de otros derivados del benzotriazol, en muestras de agua residual con los materiales Oasis® HLB y Oasis® MAX. Para ello, extrajeron entre 50 y 500 mL de muestra, en este caso a pH 7, eluyendo los analitos con 5 mL de MeOH/acetona (7:3). Observaron que con el material de modo mixto MAX, los ácidos húmicos quedaban retenidos en el adsorbente tras la elución de los compuestos de interés, mientras que con el material HLB estas interferencias coloreadas eluían junto a los benzotriazoles. Siguiendo esta estrategia obtuvieron recuperaciones de entre 96 y 102%, con límites de cuantificación (*limit of quantification*, LOQ) inferiores a 28 ng L⁻¹ para los analitos que también se estudian en esta Tesis.

SPE con material Oasis® HLB es también el método más usado en las campañas de muestreo para análisis multiresiduo en las que los benzotriazoles han sido incluidos [18-20]. En ellas se extraen entre 100 y 500 mL de muestra y la elución se lleva a cabo con 4-6 mL de metanol seguido, en ocasiones, de una segunda fracción de acetato de etilo. En algún caso, la SPE se ha aplicado conectada *on-line* con la técnica de determinación, acoplado directamente el cartucho extractante a la columna analítica de LC, y pasando la muestra y eluyendo el cartucho con ayuda del sistema de bombeo del cromatógrafo [21].

Tabla II.B.1 Determinación de benzotriazoles en agua mediante SPE

Analitos	Muestras	Protocolo de extracción	Análisis	R (%)	Ref
BTri 5-TTri XTri	50 mL (influyente) 100 mL (efluente, agua superficial)	Oasis HLB 60 mg Acond: 5 mL MeOH/acetona (6:4), 5 mL Agua Lavado: 0.5 mL Agua Elución: 7 mL MeOH/acetona (6:4)	LC-MS/MS	95-113	[10]
BTri TTri	100 mL (agua superficial) pH 2.5-3	Oasis HLB 60 mg Acond: 6 mL MeOH, 6 mL Agua Elución: 1.5 mL diclorometano (3% MeOH)	LC-MS/MS	97-99	[11]
BTri TTri	25 mL (influyente, efluente) 100 mL (agua superficial) pH 2.5-3	Oasis HLB 60 mg Acond: 6 mL MeOH, 6 mL Agua Elución: 1.5 mL diclorometano (3% MeOH)	LC-MS/MS	97-99	[12]
BTri 4-TTri 5-TTri XTri 5Cl-BTri	1 L (agua superficial, agua potable) pH 2	Oasis HLB 500 mg Acond: 10 mL ACN, 10 mL MeOH, 10 mL Agua Elución: 7.5 mL MeOH/ACN (1:1)	LC-MS/MS	75-125	[13]
BTri 4-TTri	200 mL (agua superficial) pH 2	Strata-X 100 mg Acond: 10 mL AcOEt, 10 mL MeOH, 10 mL Agua Elución: 10mL AcOEt	GCxGC-MS	66-102	[15]
BTri 5-TTri XTri	200 mL (influyente, efluente) pH 3	Strata-X 100 mg Acond: 10 mL AcOEt, 10 mL MeOH, 10 mL Agua Elución: 10mL hexano/AcOEt (1:1)	GC-MS	78-98	[16]
BTri TTri	100 mL (influyente, efluente) 500 mL (agua superficial)	Oasis MAX 150 mg Acond: 5 mL MeOH, 5 mL Agua Elución: 5 mL MeOH/acetona (7:3)	LC-MS/MS	96-102	[17]

1.2.4. Aplicaciones de SPE a la extracción de fármacos antimicóticos en muestras de agua

SPE es también la técnica preferida para la preparación de muestras de agua en las que se pretende determinar la presencia de fármacos antimicóticos. En la **Tabla II.B.2** se resumen las principales aplicaciones; de manera generalizada, se utilizan los cartuchos Oasis® HLB. Huang et al. [22] extrajeron CTZ, ECZ, KTZ y MCZ en muestras de agua (100-200 mL) con el pH ajustado previamente a 3.2 y con un contenido de NaCl de 0.1 mol L⁻¹. Los analitos fueron eluidos con 4.5 mL de metanol. Las recuperaciones obtenidas fueron superiores al 45% e inferiores al 110% y los LOQs inferiores a 6 ng L⁻¹. Años después, Peng et al. [23] analizaron estos mismos fármacos,

B. PREPARACIÓN DE MUESTRA

además del FCZ, en muestras de agua aplicando la misma metodología optimizada por Huang et al. con unos resultados similares.

Por otro lado, Peschka et al. [24] desarrollaron dos métodos para analizar el CTZ en muestras de agua: uno mediante GC-MS y otro por LC-MS/MS. La preparación de muestra en el primero de ellos consistió en hacer pasar 1 L de muestra (pH 2) a través de un cartucho Oasis® HLB y eluir el compuesto con 4.5 mL de acetona, mientras que en el segundo se extrae 1 L de muestra (pH 3) con un cartucho Strata® X y se eluye con 12 mL de metanol. En ambos casos, los extractos fueron concentrados antes de su inyección. Las recuperaciones fueron superiores al 85% mediante la primera metodología y al 88% con la segunda, mientras que los LOQs fueron inferiores a 10 ng L⁻¹ y a 5 ng L⁻¹, respectivamente. Roberts et al. [25] también cuantificaron el CTZ en muestras de agua usando cartuchos Strata® X. Para ello, ajustaron el pH de la muestra (2 L) a 3 y la pasaron a través del cartucho. Los analitos fueron eluidos con 6 mL de metanol y concentrados antes de la inyección en el instrumento.

La modalidad *on-line* de la SPE también ha sido aplicada para la determinación de azoles, entre los que se encuentran CTZ y FCZ, con cartuchos C18 [26].

Tabla II.B.2. Determinación de fármacos antimicóticos en agua mediante SPE

Analitos	Muestras	Protocolo de extracción	Análisis	R (%)	Ref
CTZ	1 L (agua superficial, agua subterránea, efluente) pH 2	Oasis HLB Acond: 6 mL hexano, 6 mL MeOH, 10 mL agua Elución: 4.5 mL acetona	GC-MS	85-107	[24]
CTZ	1 L (agua superficial, agua subterránea, efluente) pH 3	Strata-X 200 mg Acond: 6 mL MeOH, 6 mL Agua Elución: 10 mL MeOH	LC-MS/MS	88-98	[24]
CTZ	2 L (agua superficial, efluente) pH 3	Strata-X 200 mg Acond: 6 mL MeOH, 6 mL Agua Elución: 6 mL MeOH	LC-MS/MS	-	[25]
CTZ ECZ KTZ MCZ	200 mL (agua superficial) 100 mL (influyente y efluente) pH 3.2	Oasis HLB 500 mg Acond: 5 mL MeOH, 5 mL agua Elución: 4.5 mL MeOH	LC-MS/MS	34-88	[22]
CTZ ECZ FCZ KTZ MCZ	100 mL (influyente y efluente) pH 3.2	Oasis HLB Acond: 10 mL AcOEt, 10 mL MeOH, 10 mL Agua Elución: 10mL AcOEt	LC-MS/MS	41-110	[23]

1.3. TÉCNICAS DE MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

Las técnicas de microextracción surgen como alternativas más rápidas y económicas a LLE y SPE. Otras ventajas que presentan es que permiten alcanzar factores de concentración aún mayores que los obtenidos en SPE y reducen la manipulación de la muestra. La principal desventaja es que no se consiguen extracciones exhaustivas, es decir, las eficacias de extracción no son suficientemente altas como para cuantificar mediante calibración externa. Sin embargo, cuentan con una buena reproducibilidad, lo que permite realizar análisis cuantitativos contrastando las respuestas con curvas de calibrado confeccionadas a partir de extracciones llevadas a cabo con la propia técnica de microextracción.

La microextracción en fase sólida (*solid-phase microextraction*, SPME) fue la primera técnica de microextracción en aparecer. Esta metodología, que fue introducida por Pawliszyn et al. en 1989 [27] como versión miniaturizada de la SPE, consiste en exponer una pequeña fase sólida, normalmente polimérica, de unos pocos microlitros, a la muestra. De esta manera, los analitos se reparten entre la fase extractante, la muestra y el espacio de cabeza, que es el espacio disponible sobre la muestra dentro el recipiente que la contiene. Este espacio de cabeza recibe una mayor importancia cuando los analitos a extraer son volátiles y es posible extraerlos simplemente exponiendo la fase sólida en este área, sin necesidad de sumergirla en la muestra. Por tanto, en el proceso de SPME se consideran tres coeficientes de reparto: fase-muestra $K_{fs} = [A]_f/[A]_s$, espacio de cabeza-muestra $K_{hs} = [A]_h/[A]_s$ y fase-espacio de cabeza $K_{fh} = [A]_f/[A]_h$, donde $[A]_f$, $[A]_s$ y $[A]_h$ son las concentraciones del analito en la fase extractante, en la muestra y en el espacio de cabeza, respectivamente, en condiciones de equilibrio [28].

1.3.1. Etapas

El procedimiento para llevar a cabo este tipo de microextracciones consta de dos etapas [29]:

- Extracción. Los analitos son extraídos, pasando de la matriz de la muestra a la superficie de la fase extractante (adsorción), o bien, a su interior (absorción). Como se ha mencionado anteriormente, esto puede conseguirse sumergiendo la fase polimérica en la muestra o exponiéndola a su espacio de cabeza.

- Desorción. Los analitos son transferidos desde la fase extractante a otro medio susceptible de ser analizado, como un disolvente orgánico. Algunos dispositivos extractantes permiten además realizar la desorción directamente en el inyector de un cromatógrafo de gases, mediante la aplicación de calor.

1.3.2. Dispositivos

El dispositivo más extendido para efectuar microextracciones en fase sólida es la fibra capilar de SPME comercializada por Supelco, **Figura II.B.2A**. Esta herramienta consiste en una aguja con las mismas dimensiones que las microjeringas utilizadas en cromatografía de gases. En el interior de esa aguja se encuentra una fibra de sílice recubierta de la fase polimérica extractante. Este mecanismo consta de un pulsador que permite el deslizamiento de esta fase hacia fuera con la finalidad de exponerla a la muestra y poder llevar a cabo la extracción. En la actualidad existen en el mercado numerosos tipos de fases extractantes, de manera que se puede seleccionar el material más adecuado en función de la naturaleza de los analitos. Entre los polímeros apolares más utilizados destaca el PDMS, mientras que poliacrilato (PA), polietilenglicol (PEG), DVB y carboxeno (CAR) son los extractantes polares más comunes. Para desorber los analitos, se introduce la aguja en el inyector de un cromatógrafo de gases y se acciona el pulsador, provocándose la desorción térmica de las sustancias a analizar. Las fibras capilares de SPME tienen un precio elevado, pero al ser reutilizables su aplicación está muy extendida, a pesar de los efectos de memoria que se pueden presentar [30].

Otro dispositivo comercial es el Twister® (**Figura II.B.2B**), distribuido por Gerstel, que fue utilizado por primera vez por Baltussen et al. en 1999 [31]. Este mecanismo de extracción, conocido genéricamente como extracción por sorción con barra agitadora (*stir-bar sorptive extraction*, SBSE), consiste en una barra agitadora de vidrio recubierta con la fase extractante. Así, al agitar la muestra con esta barra se produce la absorción/adsorción de los analitos. La principal desventaja que tiene es la escasa variedad de fases extractantes. Hasta el momento sólo están disponibles barras recubiertas con polidimetilsiloxano (PDMS) y con polietilenglicol/polidimetilsiloxano (PEG/PDMS).

Recientemente se ha desarrollado un nuevo tipo de dispositivos, conocido como extracción con polímeros modificados químicamente (*fabric-phase sorptive extraction*, FPSE),

que incorpora un gran volumen de adsorbente sobre una pequeña porción de tela a base de celulosa, **Figura II.B.2C**. Esta nueva metodología permite extracciones más rápidas, llegando a alcanzar condiciones de equilibrio en tiempos inferiores a dos horas, a la vez que logra eficacias de extracción superiores a lo esperado para una técnica de microextracción [32].

Además de los dispositivos comerciales mencionados en estos párrafos, también se han desarrollado métodos analíticos en los que se describen procedimientos de microextracción en fase sólida con materiales extractantes de grado técnico como el PDMS, el polipropileno (PP), la poliétersulfona (PES) y el Kevlar [33] (**Figura II.B.2D**). Estos polímeros están disponibles en el mercado en formatos de tubo, cuerda y lámina [34] y su coste es realmente bajo, 0.05 EUR cm^{-1} , por lo que pueden considerarse desechables y ser aplicados una sola vez, evitándose la aparición de efectos de memoria y contaminaciones cruzadas.

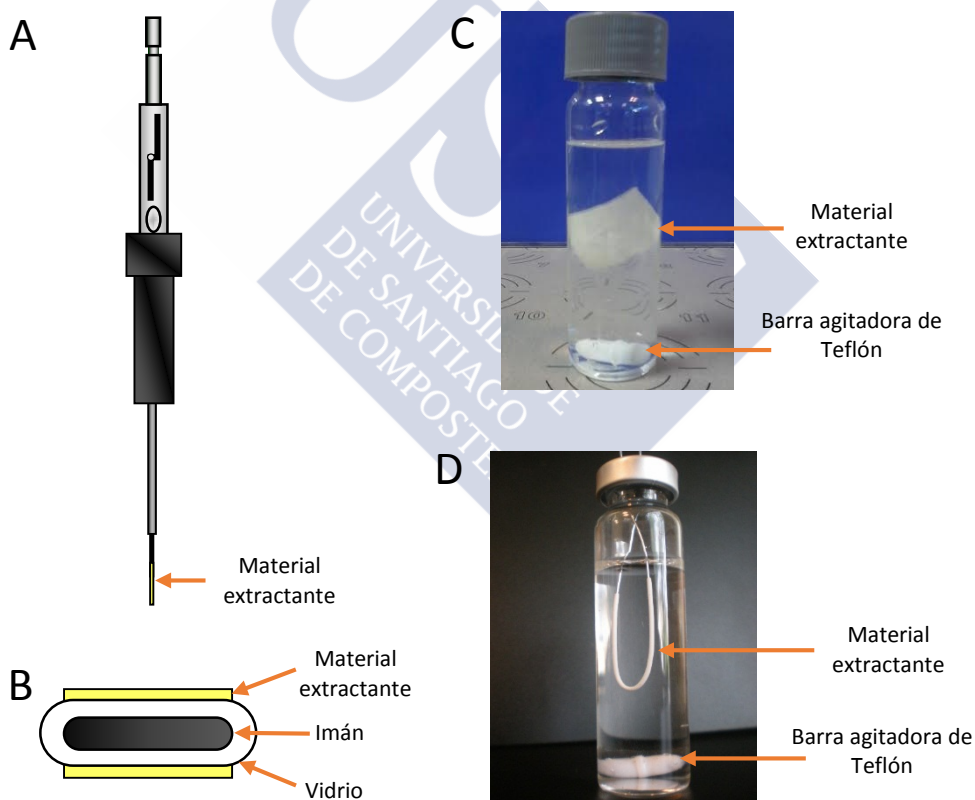


Figura II.B.2. Principales dispositivos de microextracción en fase sólida: **A** SPME con fibra capilar, **B** SBSE, **C** CPSE, **D** SPME con material extractante de grado técnico

Las variables más importantes que afectan a la SPME son la naturaleza del polímero extractante utilizado, el tiempo de extracción, la temperatura de la muestra, la fuerza iónica de la misma y su pH [30].

Prieto et al. [33] compararon la capacidad extractante de PES, PDMS, PP y Kevlar para un grupo de contaminantes orgánicos de diferente polaridad, $\log K_{ow}$ entre -0.07 y 6.88, en muestras de agua, obteniendo las mejores recuperaciones con PES. Desarrollaron una aplicación analítica consistente en extraer durante 5 horas con 1 cm de tubo de PES una muestra de 75 mL, habiendo añadido un 30% de NaCl para extraer los analitos más polares, o un 20% de metanol para los apolares. A continuación, los tubos de PES se desorben en acetato de etilo y los extractos se inyectan en un GC-MS. Los límites de cuantificación alcanzados con esta metodología son de entre 0.1 y 85 ng L⁻¹.

1.3.3. Aplicaciones de SPME a la extracción de benzotriazoles en muestras de agua

La SPME con fibra ha sido utilizada para la extracción de BUVSs (UV-P, UV-326, UV-327 y UV-328) en muestras de agua. El método desarrollado por Carpinteiro et al. [35] consiste en exponer la fibra de PDMS-DVB al espacio de cabeza de una muestra de 15 mL de agua, con un 15% de cloruro de sodio, a una temperatura de 100 °C y agitando la muestra durante 30 minutos con una barra magnética. A continuación, se desorbe la fibra directamente en el inyector del GC-MS, utilizado para el análisis de las sustancias extraídas, a una temperatura de 270 °C. Los LOQs obtenidos con esta metodología son inferiores a 2 ng L⁻¹ para todos los compuestos.

Para la preparación de muestras de agua con el fin de determinar inhibidores de corrosión benzotriazólicos en ella hay una aplicación optimizada por Gilart et al. [36] en la que extrajeron BTri y otros ECs mediante la modalidad SBSE con Twister®. En este trabajo se compararon varios recubrimientos, 24 µL de PDMS, 32 µL de PEG/PDMS y 25 µL de PA, obteniéndose los mejores resultados con PEG/PDMS. En términos de eficacias de extracción absolutas, éstas fueron similares con cualquiera de ellos, no superiores al 1%, y los LOQs alcanzados variaron entre 20 y 40 ng L⁻¹.

1.4. TÉCNICAS DE MICROEXTRACCIÓN EN FASE LÍQUIDA

De manera análoga a las técnicas de microextracción en fase sólida, surgieron técnicas de microextracción en fase líquida (*liquid-phase microextraction*, LPME). En este caso, se trata de versiones miniaturizadas de LLE, es decir, la fase extractante es líquida. En general, la LPME consiste en exponer esta fase líquida a la muestra, ya sea en forma de gota suspendida, dispersión o a través de una membrana. Una vez extraídos los analitos, se inyecta la fase extractante en el sistema de análisis, evitándose de esta manera la etapa de desorción.

1.4.1. Microextracción con gota suspendida

La microextracción con gota suspendida (*single-drop microextraction*, SDME), descrita por primera vez en 1996 por Dasgupta et al. [37] y Cantwell et al. [38], es quizás la modalidad de LPME que más se asemeja a la SPME con fibra, siendo la principal diferencia el estado de la fase extractante. Ambos procedimientos pueden llevarse a cabo por inmersión directa o en espacio de cabeza. En la modalidad de inmersión directa es indispensable que el disolvente extractante sea inmiscible con la muestra, mientras que en la espacio de cabeza lo más importante es que éste no se volatilice durante la extracción [39]. Esta metodología tiene a su favor su bajo coste y su gran poder de concentración, y en contra la formación de emulsiones entre la muestra y el extractante que provocan la disolución de la gota [40].

Para evitar este tipo de problemas se desarrollaron posteriormente variantes de SDME que incorporan el uso de membranas hidrofóbicas que contienen el disolvente extractante en su interior y se exponen de la misma manera a la muestra. Esta metodología recibe el nombre de extracción con disolvente asistida por membrana (*membrane assisted solvent extraction*, MASE). La membrana, que suele ser polietileno de baja densidad o polipropileno, cumple la función de difundir los analitos desde la muestra hasta el extractante, al mismo tiempo que separa ambas fases [41]. Por este motivo, los analitos han de ser capaces de difundir a través de la membrana, lo que limita en gran medida las aplicaciones de la MASE e implica, en ocasiones, el aumento de la temperatura de extracción [42]. Villaverde de Saa et al. [43] describieron un procedimiento de este tipo en el que extraen algunos contaminantes emergentes en muestras de agua alcanzando unos límites de detección de entre 0.1 y 1.4 ng L⁻¹ con membranas de polietileno y cloroformo como extractante.

Otra alternativa similar a la anterior es la denominada microextracción en fase líquida con fibra hueca (*hollow fiber liquid-phase microextraction*, HF-LPME), en la que se emplean membranas con una alta porosidad, de hasta el 70%, como el polipropileno, y un tamaño de poro de 0.2 μm [44]. Inicialmente esta técnica implicaba tres fases: la muestra, la fase aceptora, situada en el interior de la membrana, y un disolvente, normalmente entre 5 y 30 μL , encargado de trasladar los analitos desde la muestra hasta la fase aceptora que se encuentra impregnada en los poros de la membrana [45]. Posteriormente, la HF-LPME evolucionó hacia estrategias de dos fases, en las que el disolvente que está impregnado en los poros es el mismo que el que actúa como extractante [46].

1.4.2. Microextracción líquido-líquido dispersiva

La microextracción líquido-líquido dispersiva (*dispersive liquid-liquid microextraction*, DLLME) es otra metodología fundamentada en los principios de la LPME que fue presentada en 2006 y que ha adquirido un gran protagonismo en los últimos años. En esta técnica se favorece el contacto entre la fase extractante y la muestra mediante una emulsión que se forma gracias a que el extractante, que es inmisible en la muestra acuosa, se introduce en ella de manera muy rápida, habiendo sido mezclado previamente con un disolvente que es miscible tanto en la muestra como en el extractante. La emulsión hace que la superficie de la interfase entre la muestra y el extractante sea muy grande, lo que acelera la transferencia de los analitos. A continuación se separan las fases, mediante centrifugación, y se retira el disolvente extractante [47].

El volumen de fase extractante utilizado es muy pequeño, entre 5 y 200 μL , y el volumen de la muestra también es relativamente pequeño, entre 5 y 20 mL. Los extractantes ideales son aquellos más densos que el agua porque permiten una fácil separación de ambas fases en un tubo cónico tras la etapa de centrifugado. Así, se han utilizado disolventes como clorobenceno, tricloroetano, tetracloruro de carbono y cloroformo. Otros investigadores han usado undecanol, dodecanol o hexadecano aprovechando la facilidad de separación que presentan estos disolventes, una vez la muestra ha sido enfriada ligeramente, pues solidifican rápidamente a temperatura ambiente [48]. A pesar de esto, disolventes como hexanol, ciclohexano y tolueno, también han sido aplicados por motivos de afinidad por los analitos, con la desventaja de que la separación de fases no es tan sencilla [49].

El dispersante, que se mezcla con el extractante previamente a proceder a la extracción de los analitos presentes en la muestra en una proporción de entre 10:1 y 20:1, debe de ser miscible con el extractante, pero al mismo tiempo ha de ser miscible con la muestra acuosa; de otra manera no se formará la emulsión y el contacto del extractante con la muestra no será eficaz. Los disolventes dispersantes más comunes son metanol, acetonitrilo y acetona. El tiempo necesario para la etapa de contacto de las tres fases suele ser inferior a 2 minutos. Por otra parte, el tiempo de centrifugado tampoco es demasiado largo, menos de cinco minutos, pues de lo que trata es de separar el extractante del resto del sistema. Esto hace posible que la DLLME sea una técnica de preparación de muestra tan rápida.

1.4.3. Aplicaciones de LPME a la extracción de benzotriazoles en muestras de agua

Pena et al. [50] optimizaron una metodología de DLLME para la extracción de inhibidores de corrosión benzotriazólicos, entre los que se encontraban el BTri, 4-TTri, 5-TTri, XTri y 5-CIBTri, en muestras de 9 mL de agua. En ella se utilizan 100 μ L de tri-n-butilfosfato como disolvente extractante y 0.5 mL de metanol como dispersante. De esta manera, se obtienen recuperaciones superiores al 70%. La desventaja del uso de este agente extractante es su incompatibilidad con LC de fase reversa, por lo que hay que diluir los extractos 10 veces con metanol/agua (3:7) antes de su inyección en el instrumento.

También existe una aplicación de DLLME para la extracción de siete BUVSs en muestras de agua de mar desarrollada por Wang et al. [51]. Ésta consiste en introducir en la muestra, a un pH inferior a 6 y con un 8% de NaCl, una mezcla de 20 μ L de 1-dodecanol (extractante) y 400 μ L de metanol (dispersante) y agitar 2 minutos. Para a continuación centrifugar y separar las fases solidificando el extractante. Las recuperaciones son superiores al 68% y los LOQs alcanzados en un LC-MS/MS entre 3 y 300 ng L⁻¹.

2. MUESTRAS SÓLIDAS

A diferencia de los procesos de preparación de muestra para matrices líquidas, la evolución protagonizada por las metodologías de preparación de muestras sólidas no ha supuesto una reducción del coste del proceso, ya que, normalmente, ha ido emparejada a la aplicación de nuevas y complejas técnicas instrumentales. El motivo es que, en general, este tipo de muestras requieren condiciones de extracción más drásticas, ya que las interacciones de los analitos con la matriz son más importantes.

2.1. EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO

La extracción sólido-líquido (*solid-liquid extraction*, SLE) o lixiviación es una técnica de extracción de muestras sólidas análoga a la LLE. En este caso, el disolvente extractante se pone en contacto con una muestra sólida, que suele estar pulverizada para aumentar la superficie de interacción entre el disolvente y la matriz, y se agita mecánicamente. A continuación se separan las fases centrifugando o filtrando y, muy a menudo, se evapora el extracto para aumentar el factor de concentración del proceso, puesto que se utilizan grandes volúmenes de disolvente extractante.

Este procedimiento evolucionó muy tempranamente a lo que hoy se conoce como extracción Soxhlet. En esta versión de la técnica, la fracción de extractante en contacto con la muestra se encuentra a una temperatura elevada y es renovada continuamente con ayuda de una fuente de calor, un matraz de fondo redondo, un tubo de extracción con *by-pass* y un tubo condensador para hacer reflujos. Para llevarla a cabo se opera en ciclos que permiten obtener recuperaciones cuantitativas. Por este motivo, esta técnica es considerada como método de referencia. Otra ventaja que aporta la extracción Soxhlet respecto a la SLE clásica es la reducción del consumo de disolventes orgánicos [1].

Más recientemente se incorporó la aplicación de ultrasonidos a la SLE, extracción asistida por ultrasonidos (*ultrasound assisted extraction*, UAE). Esta estrategia acelera el proceso de difusión de los analitos de la matriz al disolvente extractante, gracias a la formación y explosión de pequeñas burbujas que generan grandes variaciones de presión y temperatura a nivel microscópico. De esta manera, se logra reducir el tiempo de extracción respecto a la metodología Soxhlet.

2.1.1. Aplicaciones de SLE a la extracción de BUVSs en muestras de lodo

Diferentes metodologías de SLE han sido utilizadas en varias ocasiones para la determinación de BUVSs en muestras medioambientales sólidas. En el método desarrollado por Zhang et al. [52] se utiliza una mezcla de acetato de etilo y cloruro de metileno para extraer estos compuestos en 5 g de muestra de sedimento, mientras que en el que optimizaron Reddy et al. [53] se usa una mezcla de acetonitrilo y hexano para el mismo tipo de muestra. Ambos procedimientos incluyen una etapa de *clean-up* para eliminar interferencias presentes en los extractos de SLE. El primero mediante SPE con sílice y el segundo por LLE. Las recuperaciones que se obtienen mediante los dos métodos son similares, superiores al 82% en el primero y al 90% en el segundo, mientras que los LOQs se encuentran por debajo de 0.33 ng g^{-1} en el primero y de 66.6 ng g^{-1} en el segundo.

También se ha aplicado la metodología Soxhlet para la extracción de BUVSs en muestras de lodo [54], sedimento y pescado [55]. Para ello se utilizan mezclas de cloruro de metileno y hexano para realizar la extracción y se ejecuta una etapa de SPE con sílica sobre los extractos como *clean-up*. Las recuperaciones que se obtienen son del rango 110-114%, mientras que los LOQs son inferiores a 0.5 ng g^{-1} .

Otra variante de la SLE, la UAE, ha sido igualmente aplicada a la extracción de estos mismos compuestos en muestras de sedimento [56]. En este caso se utiliza una mezcla de cloruro de metileno y acetato de etilo para extraer 4 g de muestra y, al igual que en caso anterior, se realiza una etapa de SPE sobre el extracto. Utilizando este método pueden obtener unas recuperaciones superiores al 70% y un LOQs inferiores a 3.3 ng g^{-1} .

2.1.2. Aplicaciones de SLE a la extracción de fármacos antimicóticos en muestras de lodo

La **Tabla II.B.3** resume las principales aplicaciones de SLE a la extracción de fármacos antimicóticos en muestras de lodo. Como se puede observar, la variante UAE es el procedimiento más utilizado. El método desarrollado por Huang et al. [22] para extraer CTZ, ECZ, KTZ y MCZ consiste en sonicar 0.1 g de muestra con tres fracciones de 4 mL de metanol (0.1% ácido fórmico) durante 15 minutos, antes de proceder a una etapa de limpieza consistente en diluir el extracto en agua y aplicarle SPE con material HLB, efectuando la elución con 4.5 mL de metanol. Las recuperaciones que se obtienen son del rango 43-83% y los LOQs son inferiores

B. PREPARACIÓN DE MUESTRA

a 9 ng g^{-1} . Peng et al. [23] aplicaron esta misma metodología para el análisis de CTZ, ECZ, FCZ, KTZ y MCZ en la materia particulada, con similares recuperaciones y LOQs.

Paralelamente, García-Valcárcel et al. [57] diseñaron otro proceso de UAE para la determinación de varios azoles, entre los que se encontraban CTZ, ECZ, FCZ y KTZ, en muestras de lodo. El método consiste en efectuar dos extracciones de 15 minutos con 5 mL de metanol sobre 1 g de muestra, filtrar el extracto y añadirle 0.1 g de C18 para eliminar interferencias. Agitar nuevamente y separar las fases. Las recuperaciones obtenidas van del 83 al 88% y los LOQs son inferiores a 16.5 ng g^{-1} .

Chen et al. [58, 59] optimizaron un procedimiento de UAE muy similar al descrito en el párrafo anterior para determinar CBZ, CTZ y MCZ en lodo. En este caso la cantidad de muestra a extraer es de 0.5 g y el extractante son 10 mL de metanol. La extracción se extiende durante 15 minutos y, a continuación, las fases se separan mediante centrifugación. El extracto se diluye con agua y se procede al *clean-up* mediante SPE con cartuchos Oasis® HLB, que se eluyen con 12 mL de acetato de etilo. Las recuperaciones alcanzadas de esta manera son superiores al 80% y los LOQs inferiores a 0.38 ng g^{-1} .

Tabla II.B.3. Determinación de fármacos antimicóticos en muestras sólidas mediante UAE

Analitos	Muestras	Protocolo de extracción	Análisis	R (%)	Ref
CTZ ECZ KTZ MCZ	0.1 g lodo	UAE: 3x4 mL MeOH (0.1% ácido fórmico), 15 min SPE: HLB, elución 4.5 mL MeOH	LC-MS/MS	43-83	[22]
CTZ ECZ FCZ KTZ MCZ	0.1 g materia particulada	UAE: 3x4 mL MeOH (0.1% ácido fórmico), 15 min SPE: HLB, elución 4.5 mL MeOH	LC-MS/MS	41-110	[23]
CTZ ECZ FCZ KTZ	1 g lodo	UAE: 2x5 mL MeOH 15 min <i>Clean-up</i> : 0.1 g C18	LC-MS/MS	83-88	[57]
CBZ CTZ MCZ	0.5 g lodo	UAE: 10 mL MeOH, 15 min SPE: HLB, elución 12 mL AcOEt	LC-MS/MS	80-102	[58]

2.2. TÉCNICAS INSTRUMENTALES DE EXTRACCIÓN

Dada la dificultad que entraña la extracción de muestras sólidas, se desarrollaron metodologías instrumentales que aumentaron las eficacias de extracción, la automatización del

proceso y, por tanto, su reproducibilidad. Las más importantes son la extracción con líquidos presurizados (**Figura II.B.3A**), la extracción asistida por microondas (**Figura II.B.3B**) y la extracción con fluidos supercríticos (**Figura II.B.3C**). El principal inconveniente de estas técnicas es la pérdida que se produce en términos de selectividad, lo que implica, en muchas ocasiones, la aplicación posterior de etapas de limpieza o *clean-up* más selectivas.

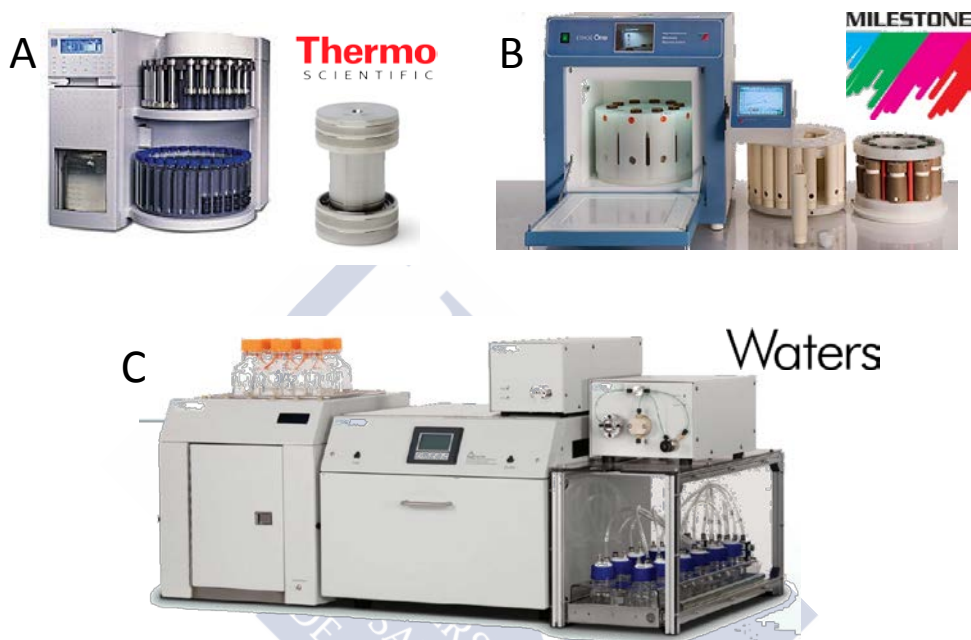


Figura II.B.3. Instrumentos de extracción de muestras sólidas: **A** extractor de líquidos presurizados ASE-Dionex® (Thermo Scientific), **B** extractor asistido por microondas (Milestone) y **C** extractor de fluidos supercríticos (Waters)

2.2.1. Extracción con líquidos presurizados

La extracción con líquidos presurizados (*pressurized liquid extraction*, PLE) consiste en aumentar la presión y la temperatura a la que se aplican los disolventes extractantes sobre la muestra, utilizándose temperaturas de entre 50 y 200 °C y presiones de entre 1500 y 2000 psi. Por un lado, las altas temperaturas favorecen la difusión de los compuestos y la solubilidad de estos en el disolvente de extracción, aumentando la velocidad del proceso, y por el otro, el uso de presiones elevadas ayuda a la penetración del extractante en la muestra y permite trabajar a temperaturas superiores al punto de ebullición de los disolventes utilizados [60]. De esta manera, se facilita la extracción de los analitos.

En general, PLE ofrece extracciones cuantitativas pero no selectivas, ya que las drásticas condiciones aplicadas favorecen la extracción de casi cualquier compuesto orgánico soluble en los disolventes extractantes utilizados, extrayéndose multitud de sustancias al mismo tiempo. Por tanto, la principal desventaja de la técnica, además del coste de adquisición del instrumento, es que suele ser necesario aplicar una etapa de limpieza del extracto, ya sea introduciendo adsorbentes selectivos debajo de la muestra en la misma celda de extracción (*on-line*) o aplicando SPE al extracto primario, en una etapa posterior (*off-line*).

Carpinteiro et al. [61] optimizaron un método de PLE para extraer varios BUVSs en muestras de polvo obtenidas en atmósferas interiores. Para ello, mezclaron 0.5 g de polvo, con 1 g de arena y lo colocaron sobre 1 g de sílica en una celda de extracción. El disolvente extractante consistió en una mezcla de hexano y cloruro de metileno (7:3), que se aplicó a una temperatura de 90 °C y una presión de 1500 psi. De esta manera, se consigue recuperar más del 82% del contenido de los analitos en las muestras, con LOQs inferiores a 10 ng g⁻¹ en todos los casos.

PLE también ha sido aplicado para extraer BUVSs en muestras de lodo. Liu et al. [62] y Ruan et al. [63] utilizaron una mezcla de hexano y cloruro de metileno, obteniendo recuperaciones superiores al 90% y al 83% y LOQs inferiores a 27.4 ng g⁻¹ y a 0.77 ng g⁻¹, respectivamente.

2.2.2. Extracción asistida por microondas

La extracción asistida por microondas (*microwave assisted extraction*, MAE) utiliza la energía producida por radiación de la región de las microondas para hacer vibrar las moléculas polares o polarizables, aumentando consecuentemente la temperatura del disolvente extractante y favoreciendo la migración de los analitos desde la muestra [64]. De nuevo, la principal desventaja es que requiere la adquisición de instrumental, a lo que hay que añadir que es necesario filtrar el extracto obtenido, pues contiene el sólido de la muestra en suspensión [65]. A su favor podemos decir que el consumo de disolventes es más reducido que en el caso de PLE y que se trata de una técnica rápida y reproducible.

Montesdeoca-Esponda et al. [66] llevaron a cabo extracciones de BUVSs, entre los que se encontraban UV-P, UV-326, UV-327, UV-328 y UV-329, en muestras de lodo y sedimentos

mediante MAE. El proceso aplicado consiste en introducir en el vial de extracción 1 g de muestra junto a 2 mL de acetonitrilo, cerrarlo y exponerlo a 300 W de radiación de microondas. A continuación, se filtra el extracto y se realiza una etapa de limpieza mediante SPE conectada *on-line* al LC. Las recuperaciones obtenidas son de entre el 46 y el 87% y los LOQs inferiores a 0.35 ng g⁻¹ para sedimentos y a 0.49 ng g⁻¹ para lodo.

2.2.3. Extracción con fluidos supercríticos

En la extracción con fluidos supercríticos (*supercritical fluid extraction*, SFE) el disolvente extractante se lleva a estado supercrítico, de manera que adquiere características propias de los gases, como el alto poder penetrante, manteniendo la capacidad solubilizadora de los líquidos. El disolvente más utilizado es el CO₂, por su bajo coste y por no ser tóxico ni corrosivo. Además es inerte, de manera que se evitan reacciones químicas indeseadas que afecten a los analitos. Por otra parte, se trata de un disolvente poco polar, que facilita la extracción de compuestos poco polares y, consecuentemente, dificulta su aplicación a la extracción de sustancias más polares [67].

2.3. DISPERSIÓN DE MATRIZ EN FASE SÓLIDA

La dispersión de matriz en fase sólida (*matrix solid-phase dispersion*, MSPD) es una técnica manual robusta que fue introducida por Barker et al. en 1989 [68]. Esta metodología se asemeja a PLE en el sentido de que las extracciones se realizan en tubos, en este caso tubos de jeringa desechables en lugar de celdas, donde se introduce la muestra y se extraen los analitos al hacer pasar el disolvente extractante a través de ella. La principal diferencia es que no se ejerce control sobre la temperatura o la presión de los experimentos, llevándose a cabo las extracciones en condiciones ambientales. Además, MSPD es difícilmente automatizable y requiere la presencia del operador prácticamente en todo momento. Sin embargo, es una técnica mucho más asequible que PLE, puesto que no requiere la adquisición de instrumental y las cantidades de disolventes y de muestra consumidas son menores.

El fundamento de la MSPD es la destrucción mecánica de la matriz al dispersarla en un material adsorbente, con ayuda de un mortero, y la posterior elución de los analitos con un disolvente orgánico que presenta afinidad por los compuestos de interés. Por tanto, la eficacia y la selectividad del proceso dependen fundamentalmente del dispersante y del disolvente

escogidos [5]. Una peculiaridad de la MSPD es que, además de aplicarse a muestras sólidas, también es útil para muestras líquidas o semisólidas como bebidas, geles y emulsiones [3].

2.3.1. Etapas

La MSPD consta de las siguientes etapas, que se representan gráficamente en la **Figura II.B.4** [30, 69]:

- **Dispersión de la muestra.** Con objeto de romper las interacciones analito-matriz, la muestra se dispersa sobre la superficie de un material sólido, normalmente adsorbente aunque también pueden usarse soportes inertes, con la ayuda de un mortero de ágata, porcelana o vidrio hasta obtener una mezcla homogénea. Este proceso suele durar unos pocos minutos. En general, la cantidad de muestra utilizada es relativamente pequeña, normalmente inferior a 1 g, y la masa de dispersante utilizada es entre 2 y 4 veces mayor que la de muestra. Opcionalmente se pueden añadir agentes desecantes, como sulfato sódico anhidro, que ayudan a eliminar restos de agua que puede haber en las muestras.
- **Empaquetamiento.** El sólido obtenido en la etapa anterior es introducido sin grandes dificultades en un tubo de jeringa desechable de polipropileno, sobre una frita de este mismo material y cubierto por otra frita. En lugar de fritas también se puede utilizar lana de vidrio. Opcionalmente, antes de introducir la muestra dispersada en el tubo, se pueden añadir una o varias capas de adsorbentes de *clean-up* para que retengan las interferencias presentes en la muestra y eviten su elución junto a los analitos al aplicar el disolvente en la última etapa; lo que permite obtener extractos más limpios a partir de muestras extremadamente complejas. Dada la gran gama de materiales dispersantes y adsorbentes disponible en el mercado, existe una gran flexibilidad a la hora de diseñar un método de MSPD, permitiendo el desarrollo de estrategias con una alta selectividad y con recuperaciones cuantitativas.
- **Elución de los analitos.** El disolvente de elución escogido es aplicado a través del tubo, interaccionando con la muestra dispersada y disolviendo los analitos contenidos en ella, dando lugar a su elución. Generalmente, el volumen de eluyente empleado se encuentra entre 10 y 30 mL. El disolvente puede hacerse pasar por gravedad, o bien, aplicando vacío. Además, existe la posibilidad de fraccionar el proceso de elución en varias etapas,

aplicándose disolventes diferentes en cada una de ellas y aumentando la selectividad del proceso. Por ejemplo, puede aplicarse en primer lugar un disolvente que no es afín por los analitos pero que extrae interferencias y a continuación el disolvente de elución.

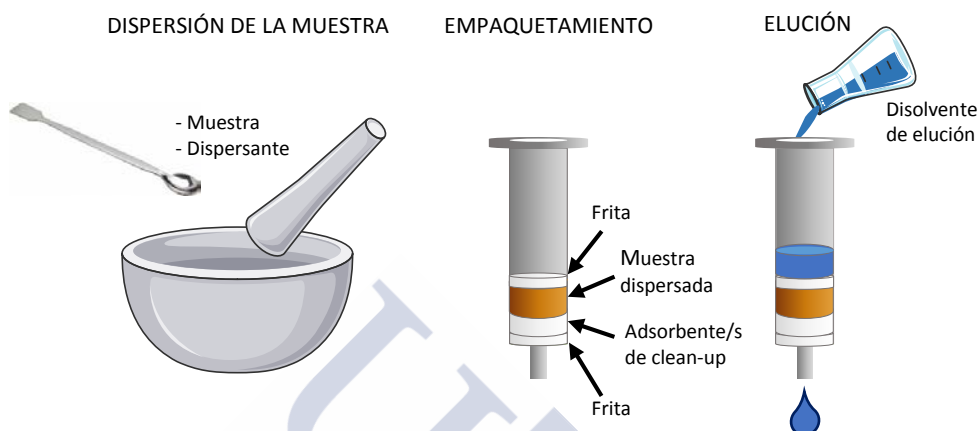


Figura II.B.4. Etapas del procedimiento de MSPD

2.3.2. Materiales dispersantes

En las primeras aplicaciones de la MSPD, Barker et al. utilizaron dispersantes basados en la sílice como el octilsilano (C8) y el octadecilsilano (C18) [70], lo que asemeja en gran medida el proceso de la MSPD a la cromatografía de líquidos en fase reversa. Las largas cadenas hidrocarbonadas presentes en la superficie de estos adsorbentes favorecen la destrucción de la muestra, facilitando el acceso del disolvente hacia los analitos. Posteriormente comenzaron a utilizarse también materiales no lipofílicos, como la sílice, la alúmina y el Florisil, con los que se obtuvieron grandes resultados para la extracción de analitos más polares. Esto indica que en la MSPD no ocurren exclusivamente procesos de partición, sino también procesos de adsorción [71].

Una alternativa más sencilla a los adsorbentes es la aplicación de materiales abrasivos inertes, como la arena, la tierra de diatomeas o el Celite, que son muy útiles para destruir la matriz y, además, resultan más económicos. La desventaja es que estos agentes dispersantes no ejercen interacción alguna en el momento de la elución, por lo que la selectividad del método queda muy limitada. En el polo opuesto a estos materiales se encuentran los MIPs [72, 73], que

permiten aumentar considerablemente la selectividad del proceso de extracción. Otro tipo de material dispersante que se ha comenzado a aplicar recientemente es el grafeno [74].

2.3.3. Procedimientos de *clean-up*

Como se ha mencionado previamente, con el fin de aumentar la selectividad de las extracciones por MSPD se pueden introducir coadsorbentes que, aunque no toman partido en el proceso de dispersión, son útiles para separar los analitos de sus interferencias [75]. Para ello se añade una o más capas de adsorbentes en la columna de extracción debajo de la muestra dispersada. De esta manera, el disolvente se ve forzado a pasar a través de estas capas de adsorbentes que atrapan algunas de las interferencias proporcionando extractos más limpios, una vez ha pasado a través de la muestra. Si de lo que se trata es de evitar la elución de sustancias polares se puede usar sílice, alúmina o Florisil, en el caso de que las interferencias sean apolares puede emplearse C18. Otro material utilizado frecuentemente son las aminas primarias y secundarias enlazadas a sílice (PSA), capaces de retener sustancias ácidas, como los ácidos grasos o los ácidos húmicos que suelen estar presentes en las muestras medioambientales más complejas, por procesos de cambio iónico.

Otra opción para purificar los extractos es empaquetar los coadsorbentes en una segunda jeringa o incluso utilizar un cartucho de SPE en una etapa de *clean-up*. Se trata de una forma de operar análoga a la publicada por Spinnel et al. [76] en la que desarrollan un método de PLE modular en el que la muestra se encuentra contenida en una primera celda de extracción conectada a una segunda celda que porta los coadsorbentes de *clean-up*. Esto alarga el proceso, pues una vez terminada la extracción por MSPD hay que seguir los pasos del protocolo de SPE, pero aporta una elevada selectividad al resultado final del proceso. Además, en el mercado hay disponible una gran gama de cartuchos de SPE que flexibiliza en gran medida esta etapa, dotándola de una elevada versatilidad al posibilitar el empleo de diferentes disolventes en las etapas de extracción y *clean-up*. El proceso de MSPD-SPE puede abordarse desde dos puntos de vista, según se busque la retención de los analitos en el adsorbente de SPE, para su posterior recuperación, o la retención de las interferencias, dejando pasar el extracto con los analitos a través del cartucho [3].

2.3.4. Aplicaciones de MSPD a la extracción de BUVSs en muestras medioambientales

Carpinteiro et al. [77] optimizaron un procedimiento de MSPD aplicado a la extracción de BUVSs en muestras de sedimentos. En primer lugar se mezclan 0.5 g de muestra con la misma cantidad de sulfato sódico anhidro, para eliminar los restos de agua, y se hace una dispersión con 1 g de tierra de diatomeas durante 5 minutos. El sólido resultante de la dispersión se transfiere al interior de una jeringa y se procede a eluir los analitos con 5 mL de cloruro de metileno, haciendo pasar el extracto por una capa de 0.5 g de sílice (desactivada al 10%), que se sitúa también dentro de la jeringa justo debajo de la muestra. El extracto obtenido se concentra a un volumen final de 1 mL en isooctano antes de su inyección en el instrumento analítico. Las recuperaciones obtenidas fueron superiores al 78%.



3. BIBLIOGRAFÍA

- [1] R. Cela, R.A. Lorenzo, M.C. Casais, *Técnicas de Separación en Química Analítica, Síntesis, Madrid, 2002.*
- [2] D.A. Cancilla, J. Martinez, G.C. van Aggelen, *Environmental Science and Technology* 32 (1998) 3834-3835.
- [3] J.B. Quintana, M. Ramil, R. Rodil, I. Rodriguez, R. Cela, *New Sample Preparation Strategies for Analytical Determinations*, in: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, Wiley, New Jersey, 2006-2014.
- [4] C.F. Poole, *Trends in Analytical Chemistry* 22 (2003) 362-373.
- [5] N.J.K. Simpson, *Solid-Phase Extraction: Principles, Techniques, and Applications*, Taylor & Francis, London, 2000.
- [6] E.M. Thurman, S. Mills, *Solid-Phase Extraction: Principles and Practice*, Wiley, New Jersey, 1998.
- [7] M.-C. Hennion, *Journal of Chromatography A* 856 (1999) 3-54.
- [8] F. Augusto, E. Carasek, R.G.C. Silva, S.R. Rivellino, A.D. Batista, E. Martendal, *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 2533-2542.
- [9] A. Beltrán, F. Borrull, R.M. Marcé, P.A.G. Cormack, *Trends in Analytical Chemistry* 29 (2010) 1363-1375.
- [10] S. Weiss, T. Reemtsma, *Analytical Chemistry* 77 (2005) 7415-7420.
- [11] W. Giger, C. Schaffner, H.P. Kohler, *Environmental Science and Technology* 40 (2006) 7186-7192.
- [12] D. Voutsas, P. Hartmann, C. Schaffner, W. Giger, *Environmental Science and Pollution Research International* 13 (2006) 333-341.
- [13] J.A. van Leerdam, A.C. Hogenboom, M.M.E. van der Kooi, P. de Voogt, *International Journal of Mass Spectrometry* 282 (2009) 99-107.
- [14] A.G. Asimakopoulos, A.A. Bletsou, Q. Wu, N.S. Thomaidis, K. Kannan, *Analytical Chemistry* 85 (2013) 441-448.
- [15] V. Matamoros, E. Jover, J.M. Bayona, *Analytical Chemistry* 82 (2010) 699-706.
- [16] C. Domínguez, C. Reyes-Contreras, J.M. Bayona, *Journal of Chromatography A* 1230 (2012) 117-122.

- [17] I. Carpinteiro, B. Abuin, M. Ramil, I. Rodríguez, R. Cela, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 402 (2012) 2471-2478.
- [18] R. Loos, B.M. Gawlik, G. Locoro, E. Rimaviciute, S. Contini, G. Bidoglio, *Environmental Pollution* 157 (2009) 561-568.
- [19] R. Loos, G. Locoro, S. Comero, S. Contini, D. Schwesig, F. Werres, P. Balsaa, O. Gans, S. Weiss, L. Blaha, M. Bolchi, B.M. Gawlik, *Water Research* 44 (2010) 4115-4126.
- [20] K. Nödler, T. Licha, K. Bester, M. Sauter, *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 6511-6521.
- [21] S. Huntscha, H.P. Singer, C.S. McARDell, C.E. Frank, J. Hollender, *Journal of Chromatography A* 1268 (2012) 74-83.
- [22] Q. Huang, Y. Yu, C. Tang, X. Peng, *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 3481-3488.
- [23] X. Peng, Q. Huang, K. Zhang, Y. Yu, Z. Wang, C. Wang, *Science of The Total Environment* 426 (2012) 311-317.
- [24] M. Peschka, P. Roberts, T. Knepper, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389 (2007) 959-968.
- [25] P.H. Roberts, K.V. Thomas, *Science of The Total Environment* 356 (2006) 143-153.
- [26] M. Kahle, I.J. Buerge, A. Hauser, M.D. Muller, T. Poiger, *Environmental Science and Technology* 42 (2008) 7193-7200.
- [27] R.P. Belardi, J.B. Pawliszyn, *Water Pollution Research Journal of Canada* 24 (1989) 179-191.
- [28] J. Pawliszyn, *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*, Wiley, New Jersey, 1997.
- [29] J. Pawliszyn, H.L. Lord, *Handbook of Sample Preparation*, Wiley, New Jersey, 2012.
- [30] C. Cámara, C.P. Conde, *Análisis Químico de Trazas, Síntesis*, Madrid, 2011.
- [31] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, *Journal of Microcolumn Separations* 11 (1999) 737-747.
- [32] I. Racamonde, R. Rodil, J.B. Quintana, B.J. Sieira, A. Kabir, K.G. Furton, R. Cela, *Analytica Chimica Acta* 865 (2015) 22-30.
- [33] A. Prieto, R. Rodil, J.B. Quintana, I. Rodríguez, R. Cela, M. Möder, *Analytica Chimica Acta* 716 (2012) 119-127.
- [34] M. van Pinxteren, A. Paschke, P. Popp, *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 2589-2598.

- [35] I. Carpinteiro, B. Abuín, I. Rodríguez, R. Cela, M. Ramil, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397 (2010) 829-839.
- [36] N. Gilart, N. Miralles, R.M. Marcé, F. Borrull, N. Fontanals, *Analytica Chimica Acta* 774 (2013) 51-60.
- [37] H. Liu, P.K. Dasgupta, *Analytical Chemistry* 68 (1996) 1817-1821.
- [38] M.A. Jeannot, F.F. Cantwell, *Analytical Chemistry* 68 (1996) 2236-2240.
- [39] A. Sarafraz-Yazdi, A. Amiri, *Trends in Analytical Chemistry* 29 (2010) 1-14.
- [40] J. Quintana, I. Rodríguez, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 384 (2006) 1447-1461.
- [41] T. Barri, J.A. Jönsson, *Journal of Chromatography A* 1186 (2008) 16-38.
- [42] L. Chimuka, M. Michel, E. Cukrowska, B. Buszewski, *Journal of Separation Science* 32 (2009) 1043-1050.
- [43] E. Villaverde-de-Sáa, I. González-Mariño, J. Quintana, R. Rodil, I. Rodríguez, R. Cela, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397 (2010) 2559-2568.
- [44] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, *Journal of Chromatography A* 1184 (2008) 132-142.
- [45] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, *Analytical Chemistry* 71 (1999) 2650-2656.
- [46] G. Shen, H.K. Lee, *Analytical Chemistry* 74 (2002) 648-654.
- [47] M. Rezaee, Y. Assadi, M.-R. Milani Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, *Journal of Chromatography A* 1116 (2006) 1-9.
- [48] T. Rodríguez-Cabo, I. Rodríguez, M. Ramil, R. Cela, *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 6603-6611.
- [49] M.A. Farajzadeh, S.E. Seyedi, M.S. Shalamzari, M. Bamorowat, *Journal of Separation Science* 32 (2009) 3191-3200.
- [50] M.T. Pena, X. Vecino-Bello, M.C. Casais, M.C. Mejuto, R. Cela, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 402 (2012) 1679-1695.
- [51] J. Wang, H. Zhang, J. Chen, L. Zhang, *Chinese Journal of Chromatography* 32 (2014) 913-918.
- [52] Z. Zhang, N. Ren, Y.-F. Li, T. Kunisue, D. Gao, K. Kannan, *Environmental Science and Technology* 45 (2011) 3909-3916.
- [53] C.M. Reddy, J.G. Quinn, J.W. King, *Environmental Science and Technology* 34 (2000) 973-979.

- [54] H. Nakata, R. Shinohara, *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry* 4 (2010) 51-59.
- [55] H. Nakata, S. Murata, J. Filatreau, *Environmental Science and Technology* 43 (2009) 6920-6926.
- [56] Y. Kameda, K. Kimura, M. Miyazaki, *Environmental Pollution* 159 (2011) 1570-1576.
- [57] A.I. García-Valcárcel, J.L. Tadeo, *Journal of Separation Science* 34 (2011) 1228-1235.
- [58] Z.-F. Chen, G.-G. Ying, Y.-B. Ma, H.-J. Lai, F. Chen, C.-G. Pan, *Science of The Total Environment* 452-453 (2013) 377-383.
- [59] Z.-F. Chen, G.-G. Ying, Y.-B. Ma, H.-J. Lai, F. Chen, C.-G. Pan, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61 (2013) 6198-6206.
- [60] J.L.L. García, D.L. de Castro, *Acceleration and Automation of Solid Sample Treatment*, Elsevier, Amsterdam, 2002.
- [61] I. Carpinteiro, B. Abuin, I. Rodriguez, M. Ramil, R. Cela, *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 3729-3735.
- [62] Y.S. Liu, G.G. Ying, A. Shareef, R.S. Kookana, *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 5328-5335.
- [63] T. Ruan, R. Liu, Q. Fu, T. Wang, Y. Wang, S. Song, P. Wang, M. Teng, G. Jiang, *Environmental Science and Technology* 46 (2012) 2071-2079.
- [64] C. Cámara, P.F. Hernando, *Toma y Tratamiento de Muestras, Síntesis*, Madrid, 2002.
- [65] K. Ridgway, S.P.D. Lalljie, R.M. Smith, *Journal of Chromatography A* 1153 (2007) 36-53.
- [66] S. Montesdeoca-Esponda, Z. Sosa-Ferrera, J.J. Santana-Rodríguez, *Journal of Separation Science* 36 (2013) 781-788.
- [67] M.D. Luque de Castro, V. Cases, *Extracción con Fluidos Supercríticos en el Proceso Analítico*, Reverté, Barcelona, 1993.
- [68] S.A. Barker, A.R. Long, C.R. Short, *Journal of Chromatography A* 475 (1989) 353-361.
- [69] A.L. Capriotti, C. Cavaliere, P. Giansanti, R. Gubbiotti, R. Samperi, A. Laganà, *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 2521-2532.
- [70] S.A. Barker, *Journal of Chromatography A* 885 (2000) 115-127.
- [71] M. García-López, P. Canosa, I. Rodríguez, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391 (2008) 963-974.
- [72] F. Qiao, H. Sun, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 53 (2010) 795-798.
- [73] T. Wang, J. Tong, M. Sun, L. Chen, *Journal of Separation Science* 34 (2011) 1886-1892.

- [74] Q. Liu, J. Shi, J. Sun, T. Wang, L. Zeng, N. Zhu, G. Jiang, *Analytica Chimica Acta* 708 (2011) 61-68.
- [75] E.M. Kristenson, U.A.T. Brinkman, L. Ramos, *Trends in Analytical Chemistry* 25 (2006) 96-111.
- [76] E. Spinnel, P. Haglund, *LC GC North America* 28 (2010) 544-552.
- [77] I. Carpinteiro, B. Abuín, M. Ramil, I. Rodríguez, R. Cela, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 402 (2012) 519-527.



II. C. ANÁLISIS



La técnica de análisis instrumental más aplicada para la determinación de contaminantes emergentes es la espectrometría de masas. El motivo principal es la gran cantidad de información que ofrece: relaciones isotópicas entre átomos, composición elemental de las muestras, estructura molecular y concentración de las sustancias presentes en las muestras [1].

Además, con el fin de aumentar la selectividad del análisis por espectrometría de masas, hace décadas que se aplican técnicas de separación *on-line* como la cromatografía de gases, la cromatografía de líquidos y la electroforesis capilar, acopladas a la fuente de ionización de los espectrómetros de masas. De esta manera, se añade una dimensión adicional al proceso analítico, que permite separar los componentes de una muestra compleja para poder identificarlos y cuantificarlos por separado.

En función del tipo de interacción que se da entre el soluto y la fase estacionaria, las técnicas cromatográficas pueden clasificarse en cromatografía de adsorción, de partición, de intercambio iónico, de exclusión molecular o de afinidad. En esta Tesis nos centramos en la cromatografía de partición, que es la que más aplicaciones analíticas tiene.

En la cromatografía de partición los componentes de una muestra interactúan con dos fases: una estática, denominada fase estacionaria, y otra dinámica, conocida como fase móvil. Así, el principio en el que se fundamentan estas separaciones es la diferente afinidad de las sustancias por una u otra fase. La fase estacionaria se dispone en el interior de un tubo y la fase móvil fluye a través de él arrastrando a la muestra o, en su caso, al extracto. Las sustancias más afines a la fase estacionaria interactuarán más fuertemente con ella y tendrán tiempos de retención más largos, mientras que los compuestos menos afines tienden a abandonar el tubo más rápidamente. En función de la naturaleza de la fase móvil, la cromatografía se clasifica en cromatografía de gases, en la que la fase móvil es un gas, y cromatografía de líquidos, cuya fase móvil es un líquido.

La calidad de las separaciones cromatográficas viene dada por dos factores: la diferencia entre los tiempos de retención de los picos cromatográficos, cuanto mayor es esta diferencia mejor es la separación, y la anchura de los mismos, cuanto menor es esta anchura mejor es la separación. El parámetro de calidad que mide el efecto de estos dos factores para dos picos cromatográficos consecutivos es la resolución (R_s), que se define como la fracción entre la diferencia de los tiempos de retención de ambos picos y la anchura media de los mismos [2], tal

y como se define en la **Ecuación II.C.1**, donde t_{ret1} y t_{ret2} son los tiempos de retención de los picos 1 y 2, respectivamente, y w_1 y w_2 es el ancho de cada uno de ellos.

$$\text{Factor de resolución (Rs)} = \frac{t_{ret2} - t_{ret1}}{\frac{1}{2}(w_1 + w_2)} \quad \text{(Ecuación II.C.1)}$$



1. ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Como se ha mencionado anteriormente, la espectrometría de masas (*mass spectrometry*, MS) es la técnica instrumental más utilizada para el análisis de contaminantes emergentes. Esta afirmación puede extenderse a otro tipo de compuestos orgánicos generados en procesos bioquímicos, como la proteómica y la metabolómica. MS también es útil para el análisis de sustancias inorgánicas e, incluso, para la determinación de cinéticas de reacción y parámetros termodinámicos.

El principio en el que se basa MS es la separación de los iones de distinta relación masa/carga (m/z). Esta separación puede basarse en el momento inducido al someter los iones a un campo magnético, como ocurre en el analizador de sector magnético, en la estabilidad de trayectorias de movimiento creadas por diferencias de potencial y radiofrecuencias en un cuadrupolo, en la frecuencia de resonancia de cada ion en una trampa de iones o en un analizador de resonancia de ion ciclotrón, o en la diferente velocidad que adquieren los iones al aplicar un determinado potencial sobre los mismos, como se hace en el analizador de tiempo de vuelo [3].

1.1. ANALIZADOR

La parte central de los espectrómetros de masas es el analizador de masas, que es el elemento responsable de llevar a cabo la separación de los iones mediante uno de los principios mencionados en el párrafo anterior. Los analizadores de masa más populares son el cuadrupolo y la trampa de iones. Una vez los iones han sido separados, éstos impactan en el detector que genera una corriente eléctrica proporcional a su abundancia.

1.1.1. Cuadrupolo

El analizador cuadrupolar (*quadrupole*, Q) [4] consiste en cuatro electrodos cilíndricos situados paralelamente y enfrentados dos a dos, de manera que en el centro queda una región hiperbólica por donde pasan los iones, **Figura II.C.1A**. A los electrodos se les aplica una diferencia de potencial y una radiofrecuencia, que inducen desviaciones en la trayectoria lineal de los iones que pasan por su interior, en función de su relación masa/carga (m/z). Así, para cada combinación de valores de diferencia de potencial y radiofrecuencia sólo los iones de una

m/z concreta son capaces de pasar entre los cuatro electrodos sin colisionar con ninguno de ellos. Por tanto, el cuadrupolo es un analizador de escaneo que hace un barrido de potenciales provocando que, en un momento dado, sólo los iones de una determinada m/z sean detectados.

El cuadrupolo también puede operar en modo de monitorización de ion seleccionado (*selected-ion monitoring*, SIM) en el que solamente se mide uno o varios iones característicos de los analitos a determinar con la consecuente ganancia exponencial en la respuesta obtenida para estos iones.

1.1.2. Trampa de iones

Al igual que los cuadrupolos, las trampas de iones (*ion trap*, IT) son analizadores de escaneo, con la diferencia de que aplican un campo de radiofrecuencia cuadrupolar para hacer oscilar los iones en su interior a una determinada frecuencia de resonancia e irlos extrayendo hacia el detector en función de su m/z [5].

Estructuralmente, las ITs pueden tener la forma de un cuadrupolo que ha sido doblado sobre sí mismo, caso de las trampas tridimensionales (**Figura II.C.1B**), o la apariencia de un cuadrupolo normal al que se le han añadido lentes de iones en cada extremo que permiten atrapar los iones en su interior, caso de las trampas lineales. Una vez los iones han sido acelerados, son extraídos radialmente hacia los detectores a través del espacio disponible entre los electrodos. [6].

El analizador Orbitrap [7] es otro tipo de trampa de iones que ha experimentado una extraordinaria evolución en los últimos años. La gran diferencia que presenta respecto a las otras ITs es que la naturaleza de la fuerza aplicada en su interior es electrostática y se aplica entre un electrodo externo, con forma de barril, y uno central, con forma de huso. Además utiliza la transformada de Fourier para adquirir datos más rápidamente.

1.1.3. Analizador de tiempo de vuelo

Al contrario que los cuadrupolos y las trampas de iones, el analizador de tiempo de vuelo (*time-of-flight*, TOF) [8] no es un analizador de escaneo, sino que analiza todos los iones juntos y al mismo tiempo, **Figura II.C.1C**. Para ello, en este tipo de instrumentos se aplica un pulso de potencial, de entre 10^3 y 10^4 V, sobre los iones que van llegando al acelerador, para que cada

uno de ellos adquiera una velocidad de desplazamiento inversamente proporcional a su m/z y puedan ser detectados en cascada. El movimiento de los iones se produce en el interior de un tubo sometido a alto vacío que recibe el nombre de tubo de vuelo. El grupo de iones acelerados en cada pulso es denominado *transient* y todos los iones contenidos en él son analizados juntos al llegar al detector de manera consecutiva.

A partir de la década de los 90, los TOF experimentaron una evolución importante al incorporar el acelerador ortogonal, que aplica el pulso de potencial perpendicularmente a la dirección del movimiento de los iones procedentes de la fuente. Otro adelanto notorio es el *reflectron*, que consiste en unos anillos que frenan los iones hasta que son expelidos en sentido contrario, aumentando drásticamente su capacidad para diferenciar iones con m/z muy parecidas. Ambos avances le confieren a estos analizadores un gran poder resolutivo y una elevada exactitud de masas, dándoles la capacidad de establecer fórmulas empíricas para cualquier compuesto que haya sido detectado por el sistema. Así es posible evaluar la presencia de compuestos no preseleccionados en la muestra analizada, una vez el análisis ha finalizado (*post-target analysis*).

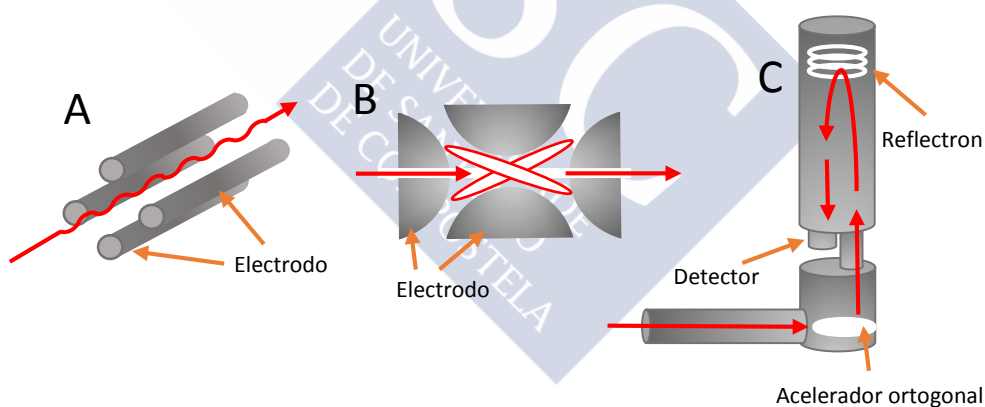


Figura II.C.1. Analizadores de masas: **A** analizador cuadrupolar, **B** trampa de iones, **C** analizador de tiempo de vuelo

1.2. PARÁMETROS DE CALIDAD

Los parámetros de calidad de un espectrómetro de masas recaen principalmente en el tipo de analizador instalado en el instrumento. Algunos de los más importantes son el rango de adquisición, que es el rango de m/z de los iones que se miden, la velocidad de análisis a la que

el analizador puede adquirir en un determinado rango de masas, el ciclo de trabajo, la sensibilidad, la resolución y la exactitud de masas [3].

1.2.1. Ciclo de trabajo

El ciclo de trabajo (*duty cycle*) es la fracción de iones analizados respecto al número total de iones generados por una fuente continua. En un cuadrupolo simple el tiempo perdido entre escaneos es muy pequeño, por lo que operando en modo SIM, el ciclo de trabajo de este instrumento se aproxima al 100%. En modo *scan* este valor se ve reducido drásticamente, dependiendo principalmente del rango de adquisición. Por su parte, la trampa de iones recoge iones en lotes, por lo que pierde una parte importante de los mismos, disminuyendo su ciclo de trabajo hasta valores en torno al 75%. El analizador utilizado en la mayor parte de los trabajos realizados en esta Tesis es el TOF, que tiene un ciclo de trabajo realmente bajo que raramente supera el 30%; no obstante, superior al que ofrecen los cuadrupolos convencionales en modo *scan*.

1.2.2. Sensibilidad

La sensibilidad se define como la variación en la corriente iónica que genera un cambio en la cantidad de analito en la fuente de ionización. Por tanto, la sensibilidad depende principalmente de la transmisión de iones entre cada una de las partes del instrumento, de su ciclo de trabajo y de la eficacia del detector.

1.2.3. Resolución

La resolución es la capacidad de distinguir la señal procedente de dos iones con relaciones m/z próximas entre sí. Este parámetro se calcula como la fracción entre la m/z del ion y el ancho de su señal a media altura (*full width at half maximum*, FWHM) [9]. Normalmente, un factor de resolución de 10000 ejerce de frontera entre la baja y la alta resolución. El analizador de resonancia de ion ciclotrón, TOF y Orbitrap son los equipos que actualmente pueden adquirir a alta resolución, además de los sistemas de doble enfoque.

1.2.4. Exactitud de masas

La exactitud de masas contrasta la m/z medida por el instrumento con la m/z teórica correspondiente a un determinado ion. El error de masas en partes por millón (ppm) se calcula según la **Ecuación II.C.2**, donde m/z_{exp} es la m/z medida por el instrumento y m/z_{teo} es la m/z correspondiente al ion medido.

$$\text{Error (ppm)} = \frac{m/z_{\text{exp}} - m/z_{\text{teo}}}{m/z_{\text{teo}}} \times 10^6 \quad (\text{Ecuación II.C.2})$$

La identificación de sustancias mediante la elucidación de su fórmula empírica y los análisis de composición elemental requieren una alta exactitud de masas a la vez que niveles de resolución medio-alto. Por tanto, para ese tipo de estudios, disponer de un analizador de alta resolución, como el TOF o el Orbitrap, es indispensable. Con este tipo de sistemas, que además presentan una gran sensibilidad, se puede evaluar la presencia de especies químicas no seleccionadas originalmente como analitos, una vez que el análisis ha finalizado (*post-target analysis*). Este tipo de estrategia ha sido seguida en varios de los trabajos llevados a cabo en la presente Tesis para identificar sustancias adicionales que estaban presentes en las muestras analizadas, pero que no habían sido valoradas durante las etapas de optimización de los procesos de preparación de muestra y determinación. Evidentemente, la detección *post-target* implica disponer de los registros correspondientes a los diferentes iones que se generan en la fuente para estos otros compuestos.

1.3. ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM

La espectrometría de masas en tándem (MS/MS) consiste en la selección de uno o varios iones mayoritarios, generados a partir de un analito en la fuente de iones, seguido de su aislamiento para, a continuación, fragmentarlos y proceder al análisis de los fragmentos originados. Este tipo de aplicaciones aportan información estructural acerca de los compuestos detectados y se utilizan para proponer fórmulas moleculares a partir de fórmulas empíricas obtenidas en instrumentos de masas exactas, o bien, para discriminar especies no resueltas en la separación cromatográfica que se identifican con m/z del ion precursor en común [10].

1.3.1. Triple cuadrupolo

El instrumento de MS/MS más extendido es el triple cuadrupolo (*triple quadrupole*, QqQ), cuyo esquema se presenta en la **Figura II.C.2**. En este sistema, el primer y tercer cuadrupolos actúan como analizadores de masas, mientras el segundo cuadrupolo es en realidad una celda de colisión que contiene un gas inerte, normalmente argón o nitrógeno, que choca con los iones a la vez que se aplica una energía que ronda los 20 eV para provocar la fragmentación de los mismos, **Figura II.C.2**. Este fenómeno se conoce como fragmentación inducida por colisión (*collision-induced dissociation*, CID). Al tratarse de analizadores cuadrupolares, cada uno de ellos puede actuar en modo SIM o *scan*. Esto permite operar en modo escaneo de iones producto (*product ion scan*), si el primer cuadrupolo funciona en modo SIM y el tercero en *scan*, o en escaneo de iones precursor (*precursor ion scan*), en caso de trabajar con la configuración opuesta. También se puede aplicar *scan* en ambos cuadrupolos, lo que recibe el nombre de escaneo de pérdida de fragmento neutro (*neutral loss scan*) o con los dos cuadrupolos en modo SIM, monitorización de reacción seleccionada (*selected-reaction monitoring*, SRM) que maximiza la relación señal/ruido al eliminar completamente las interferencias.

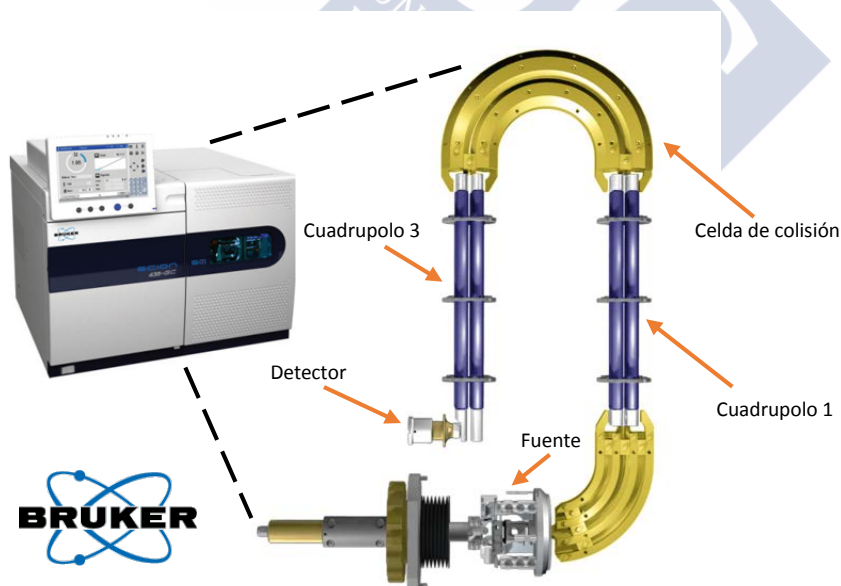


Figura II.C.2. Sistema triple cuadrupolo (Bruker)

1.3.2. Cuadrupolo-tiempo de vuelo

El sistema híbrido cuadrupolo-tiempo de vuelo (QTOF), que ha sido el utilizado en la mayoría de los desarrollos descritos en esta Tesis, consiste en un primer analizador cuadrupolar seguido de una celda de colisión, como la mencionada en el párrafo anterior, conectada a un tubo de vuelo, **Figura II.C.3.**

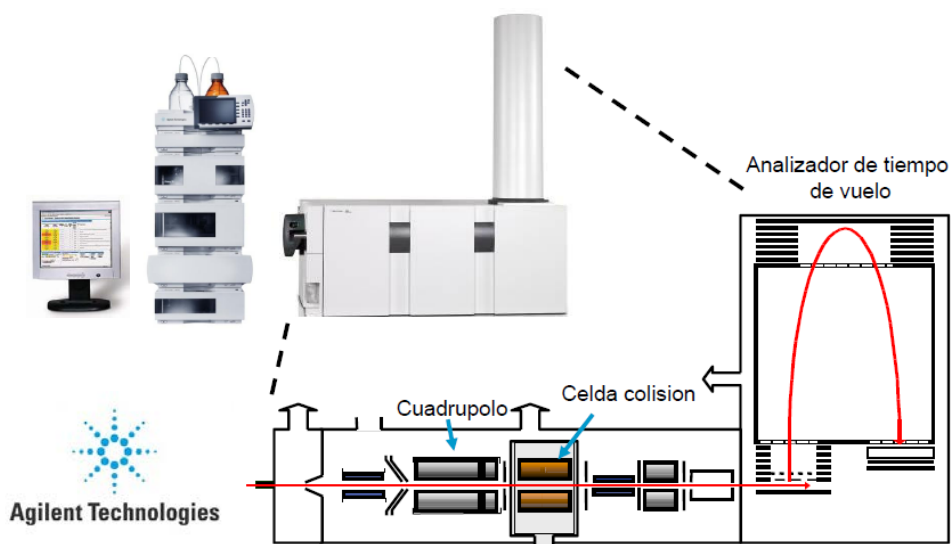


Figura II.C.3. Sistema cuadrupolo tiempo de vuelo (Agilent Technologies)

Este tipo de instrumento combina la capacidad de selección y transmisión de iones típico de los cuadrupolos, con el poder de análisis simultáneo de todos los fragmentos generados en la celda de colisión, propio de los analizadores de tiempo de vuelo. De esta forma, se pueden obtener rápidamente espectros MS/MS de masas exactas completos. Por tanto, los sistemas QTOF aportan dos tipos de información muy valiosa en un solo experimento: por un lado proporcionan la fórmula empírica de los compuestos analizados y por el otro ofrecen información acerca de la estructura de los mismos, fórmula molecular. Por consiguiente, son útiles para elucidar estructuras de compuestos desconocidos (*non-target analysis*) y también para eliminar interferencias derivadas de compuestos isobáricos en la determinación de analitos preseleccionados en muestras complejas (*target analysis*). En todas las aplicaciones analíticas desarrolladas en esta Tesis para la determinación de fármacos antimicóticos, así como en algunas de las optimizadas para el análisis de benzotriazoles y BUVSs, se han utilizado analizadores tipo QTOF.

Estos sistemas también han sido aplicados en esta Tesis con el objetivo de identificar sustancias que originalmente no habían sido preseleccionadas como analitos y compuestos de transformación generados en procesos de depuración de aguas residuales a partir de fármacos antimicóticos. Para ello, se analizan extractos correspondientes a muestras de tiempo cero, es decir, antes de aplicar ningún tratamiento sobre el agua, y de muestras tomadas a diferentes tiempos de reacción, adquiriendo los espectros de masas completos en un rango de m/z amplio. A continuación, se utiliza el *software* MassHunter Qualitative Analysis® (Agilent Technologies) para hacer una búsqueda de las sustancias que han dado señal, asignándose una fórmula empírica a cada pico cromatográfico encontrado, en base a la masa exacta y la distribución isotópica del ion molecular y sus aductos más comunes, como el $[M+Na]^+$. Seguidamente, con ayuda del *software* Agilent Mass Profiler®, los picos cromatográficos se alinean y se buscan similitudes y diferencias entre cromatogramas, observándose de esta manera la evolución del área de pico de cada compuesto a lo largo de la reacción. Finalmente, con la finalidad de asignarle una identidad a cada compuesto de transformación, se realizan experimentos de MS/MS, obteniéndose información estructural sobre cada sustancia, que nos acerca a la fórmula molecular de la misma.



2. CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Tal y como se ha apuntado al principio de este apartado, en cromatografía de gases (*gas chromatography*, GC) la fase móvil es un gas, normalmente helio, nitrógeno o hidrógeno, y la fase estacionaria sílice funcionalizada, que se comporta como un líquido anclado a las paredes de un tubo capilar. Las columnas de GC-MS miden entre 30 y 60 m de longitud y su diámetro interno varía entre 100 y 320 μm . Dependiendo de la fase enlazada a la sílice se pueden dar distintos tipos de interacciones entre la columna y los componentes de la muestra. Las fases más utilizadas, en orden creciente de polaridad, son poldimetilsiloxano (PDMS), poli(fenildimetil)siloxano (5% fenil), poli(fenildimetil)siloxano (50% fenil), polietilenglicol (PEG) y poli(dicianoalildimetil)siloxano [1].

Sin embargo, la separación de los componentes de una muestra no se basa solamente en la distribución entre la fase móvil y la fase estacionaria, también depende de la diferente volatilidad de cada uno. Para ello, la columna se sitúa en el interior de un horno cromatográfico donde se controla la temperatura de manera precisa. De esta forma, se pueden diseñar programas de temperatura para el horno con los que se facilite la separación de los compuestos en función de su volatilidad. Por este motivo, el rango de aplicación de GC se limita a sustancias volátiles o volatilizables, con puntos de ebullición inferiores a 450 $^{\circ}\text{C}$, y también con elevada estabilidad térmica, ya que su introducción en el extremo cabeza de la columna se lleva a cabo en fase vapor normalmente.

Dado el rango limitado de aplicaciones de GC, los compuestos termolábiles o cuya polaridad es muy superior a la de la fase estacionaria, son transformados previamente en otras especies más estables y/o apolares y, a ser posible, más volátiles para mejorar la resolución de los picos cromatográficos, mejorando así la detección de estas sustancias [11]. Esta estrategia analítica recibe el nombre de derivatización. La reacción de derivatización más extendida es la sililación, que consiste en la sustitución de un átomo de hidrógeno reactivo, unido generalmente a un átomo de oxígeno o de nitrógeno, por uno de silicio que está unido a un determinado grupo. Los agentes sililantes más comunes son la N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA), la N-metil-N(tert-butildimetilsilil) trifluoroacetamida (MTBSTFA) y la N,O-bis-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) [12]. Además de la sililación, existen otro tipo de reacciones sencillas que se pueden aplicar con fines analíticos como la acetilación, que consiste

en la introducción de un grupo acetilo y que se puede llevar a cabo a temperatura ambiente con anhídrido acético [13]. Esta reacción ha sido utilizada en uno de los desarrollos analíticos recogidos en la presente Tesis para la determinación de benzotriazoles mediante GC-MS.

En la **Figura II.C.4** se muestran los componentes de un instrumento de GC-MS.

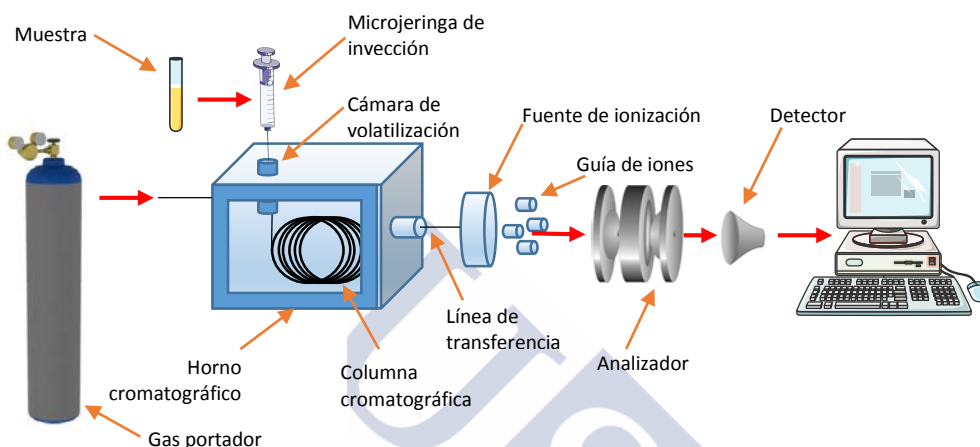


Figura II.C.4. Componentes de un cromatógrafo de gases conectado a un espectrómetro de masas

2.1. INYECCIÓN

La introducción de las muestras líquidas o de sus extractos en la cabeza de la columna cromatográfica es la etapa más compleja en GC. Por este motivo, en la actualidad la mayoría de los cromatógrafos de gases incluyen un muestreador automatizado, más conocido como *autosampler*, que reproduce el proceso de inyección, muestra tras muestra, y de una cámara de volatilización cuyas condiciones también son reproducibles. En el proceso de inyección la muestra es tomada en una microjeringa de vidrio, generalmente de entre 1 y 10 μL , que atraviesa un septum y la deposita en un cilindro de vidrio, denominado *liner*, en el interior de la cámara de volatilización. Esta cámara se encuentra a una temperatura elevada, entre 200 y 300 $^{\circ}\text{C}$ normalmente, y en ella se evaporan los analitos y se elimina parte del disolvente. En el mercado existen una gran variedad de *liners* que difieren en su forma, recta, con muesca, en zig-zag, etc, en su composición, de vidrio, recubiertos con PDMS o con poliimida, etc, y en su relleno, lana de vidrio, Tenax, etc. Normalmente, la forma del *liner* se elige en función del tipo de inyector y su composición y recubrimiento según la naturaleza de los compuestos a analizar.

Los inyectores más comunes son los denominados *split/splitless*. Éstos se caracterizan por tener una válvula cuya posición determina el modo de trabajo. En el modo *split*, tal y como su nombre indica, la muestra se divide en la cámara de volatilización, introduciéndose una parte en la columna y desechándose la otra a través de la válvula de purga (válvula de *split*). La relación entre ambas fracciones puede controlarse desde el *software* de adquisición del instrumento y suele ir desde 10:1 hasta 200:1. El modo de trabajo *split* se utiliza para muestras con una concentración demasiado alta, cuyos iones pueden saturar el detector. Contrariamente, en el modo *splitless* esta válvula se encuentra inicialmente cerrada y, transcurrido un tiempo fijado, normalmente entre 0.5 y 2 min, se abre y se deja pasar un gran flujo de gas portador para eliminar los restos de la muestra y limpiar el *liner*, evitando la aparición de efectos de memoria que pueden comprometer los LOQs. Este modo de trabajo es útil para eliminar compuestos poco volátiles a bajos niveles de concentración [11].

En los inyectores *split/splitless* los volúmenes de muestra introducidos son de entre 1 y 2 μL . Algunos cromatógrafos de gases tienen la opción de aplicar un pulso de presión en la inyección. Este pulso reduce la expansión del disolvente y reduce el ancho de las bandas en cabeza de columna [14] a la vez que mejora la transmisión de los analitos a la columna [15].

De entre los inyectores alternativos al *split/splitless* cabe destacar el inyector de temperatura programable (*programmed temperature vaporizer*, PTV). Con este dispositivo se pueden aplicar programas de temperatura, haciendo posible la inyección de volúmenes grandes de muestra. También existe la posibilidad de depositar la muestra en la columna directamente, sin utilizar un inyector, a baja temperatura. Este proceso recibe el nombre de inyección *on column* [14].

2.2. IONIZACIÓN

Una vez los analitos han sido separados cromatográficamente en estado gaseoso, deben convertirse en iones para poder ser analizados por espectrometría de masas. Este proceso tiene lugar en la fuente de ionización, en la que los analitos son introducidos a través de una línea de transferencia que, generalmente, se mantiene a una temperatura igual o superior a la temperatura final del horno cromatográfico. Las fuentes de ionización utilizadas en GC-MS son

la de impacto electrónico, también conocida como ionización electrónica, y la de ionización química.

Los primeros acoplamientos de GC con MS se llevaron a cabo a finales de los años 50 por McLafferty [16] y Gohlke [17]. No se trata de una conexión demasiado complicada, ya que tanto GC como MS operan en fase gas y el flujo de gas portador en GC es tan bajo que la columna, que se encuentra a presión atmosférica, puede ser unida directamente a la fuente, que se mantiene a vacío. La puesta a la venta de este tipo de equipos en 1975 revolucionó el análisis de compuestos orgánicos en muestras complejas, al combinar la gran sensibilidad y la importante información estructural aportada por MS con el alto poder resolutivo de GC.

2.2.1. Ionización electrónica

La parte más importante de las fuentes de ionización electrónica (*electronic ionization*, EI) es el filamento, fabricado frecuentemente en renio. Este filamento se encarga de emitir electrones que son acelerados gracias a una diferencia de potencial y que colisionan con las moléculas provocando su fragmentación. Así, iones con carga +1 formados a partir de las moléculas de analito son generados y enfocados hacia el analizador de masas [18]. Con la finalidad de reproducir el mismo patrón de fragmentación en diferentes instrumentos de GC-MS, se ha estandarizado el uso de una energía de 70 eV en el filamento. De esta forma, se pueden contrastar los espectros de masas obtenidos para una sustancia desconocida con la información contenida en bases de datos. La base de datos de GC-MS más utilizada es la del Instituto Nacional de Patrones y Tecnología de los Estados Unidos de América (*National Institute of Standards and Technology*, NIST).

2.2.2. Ionización química

En las fuentes de ionización química (*chemical ionization*, CI) un gas reactivo es introducido en exceso junto a los analitos, que previamente han sido separados en la columna. De esta manera, es este gas el que sufre la ionización con el filamento, dando lugar a un ácido de Brønsted que normalmente le cede o le sustrae un protón a las moléculas de analito, favoreciéndose la formación de iones moleculares [18], además de ciertos aductos, sobre todo en el caso de ionización química positiva (CI+) usando metano como gas de ionización.

2.3. APLICACIONES DE GC-MS A LA DETERMINACIÓN DE LAS SUSTANCIAS ESTUDIADAS

Aunque la aplicación de GC-MS para la determinación de benzotriazoles está muy limitada, debido a la alta polaridad de estos compuestos y su baja volatilidad, se han publicado metodologías con columnas de líquidos iónicos [19], cromatografía de gases bidimensional [20] y previa derivatización [21-23].

En el caso de los derivados fenólicos del benzotriazol (BUVSs), la mayor parte de las metodologías analíticas desarrolladas se basan en GC-MS. Muchas de ellas con analizadores de baja resolución, como trampas de iones [24] y analizadores cuadrupolares [25]. Sin embargo, para el análisis de extractos de muestras muy complejas, como los lodos procedentes de STPs, GC-MS muchas veces no basta para tener un buen método analítico sin complicar demasiado la etapa de preparación de muestra. En estos casos se han utilizado técnicas de GC-MS/MS con triples cuadrupolos [26, 27] o, de nuevo, con trampas de iones [28-30]. En todos estos trabajos se han empleado fuentes de ionización electrónica.

También hay alguna aplicación de GC-MS para la determinación de fármacos antimicóticos, a pesar de que la inmensa mayoría de estos estudios se hace a través de LC-MS/MS. Peschka et al. [31] analizaron CTZ en muestras de agua mediante GC-MS con cuadrupolo simple y con ionización por EI, obteniendo LOQs inferiores a 10 ng L⁻¹.

3. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS-ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La cromatografía de líquidos (*liquid chromatography*, LC) y GC son técnicas complementarias. En el punto anterior decíamos que GC se aplica al análisis de compuestos volátiles, estables térmicamente y normalmente poco polares. Por su parte, LC se utiliza para el análisis de sustancias no volátiles, generalmente más polares y que pueden ser termolábiles; por tanto, su rango de aplicación es más amplio. Sin embargo, para el análisis de aquellas sustancias que pueden ser medidas mediante ambas técnicas, generalmente se emplea GC porque es más sencilla, implica una inversión inferior y genera menos residuos [2].

En LC de partición la separación de las sustancias ocurre debido a la diferente afinidad de los analitos por la fase estacionaria. Con el fin de poder resolver selectivamente el mayor número de problemas analíticos, hoy en día se comercializan columnas analíticas para LC con un gran abanico de fases. Las más utilizadas son las de fase reversa, a base de sílice enlazada a grupos C8 o C18. Otras columnas de fase reversa, que además poseen una mayor afinidad por analitos con dobles enlaces conjugados, son las fenilo. En el lado opuesto se sitúan las columnas de fase normal, que contienen grupos ciano o amino, aplicadas para compuestos más polares, mientras que para la separación de compuestos muy polares y muy pequeños se utilizan las columnas de interacción hidrofílica (*hydrophilic interaction chromatography*, HILIC), en las que la muestra interacciona directamente con sílica, poliamidas e incluso con grupos sulfonato [1, 2].

Otros factores importantes que caracterizan a las columnas de LC son sus dimensiones y el tamaño de partícula. Su longitud suele ser de entre 10 y 30 cm, mientras que su diámetro interno oscila entre 1 y 5 mm. Por otra parte, el tamaño de partícula se sitúa en torno a las 3 μm . Cuanto más estrecha sea la columna y menor sea el tamaño de partícula, mayor será la resolución de la separación lograda. Sin embargo, a mayor longitud se maximizan los efectos de difusión y, por tanto, más anchos son los picos cromatográficos obtenidos.

En la mayoría de las ocasiones, la estrategia seguida para hacer separaciones por fase reversa es la separación en gradiente, en la que la fase móvil consiste en una mezcla de agua y uno o varios disolventes orgánicos, normalmente metanol o acetonitrilo, cuyas proporciones varían a lo largo de la separación cromatográfica. Al comienzo de la separación se utiliza una fase móvil compuesta mayoritariamente por agua y después se va incrementando

progresivamente la presencia de disolvente orgánico en la misma. Así, aumenta la fuerza del eluyente, y los analitos van siendo expulsados de la columna en orden de polaridad decreciente [32]. Para ello, los cromatógrafos de líquidos están equipados con un sistema de bombeo que permite introducir disolventes contenidos en dos o más recipientes en la cámara de mezcla e impulsar la fase móvil a través del sistema a elevadas presiones, por encima de 6000 psi, dando lugar a un flujo constante, sin pulsaciones, que mejora la repetibilidad de las separaciones [1].

En algunas ocasiones, se añaden a la fase móvil modificadores ácidos o salinos que pueden provocar incrementos de señal, mejores formas de pico e, incluso, mejores separaciones. Los modificadores ácidos más utilizados son el ácido fórmico y el ácido acético, mientras que el acetato amónico es el modificador salino adicionado en la mayor parte de los casos. En los sistemas LC-MS el tipo de modificador a emplear viene condicionado por la fuente de ionización; en general, la selección de modificadores debe limitarse a especies volátiles.

En la **Figura II.C.5** se muestran los componentes de un instrumento de LC-MS.

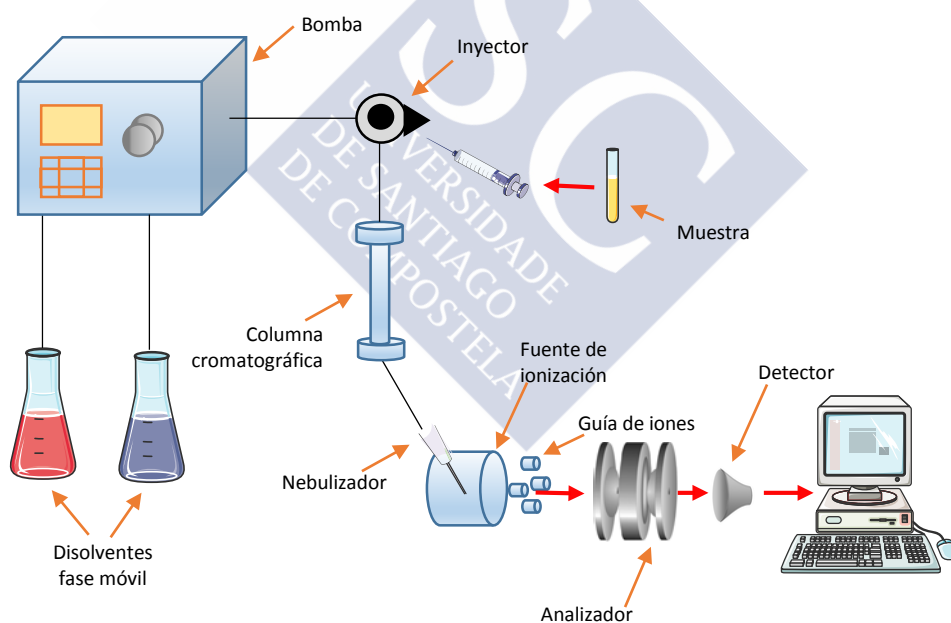


Figura II.C.5. Componentes de un cromatógrafo de líquidos conectado a un espectrómetro de masas

3.1. INYECCIÓN

Las muestras son inyectadas en el sistema por medio de una válvula de seis vías que, en la posición de *load*, dirige el flujo de fase móvil hacia la columna mientras se introduce la muestra en el *loop* de carga, y en la de *inject* dirige el flujo de fase móvil, a través del *loop*, hacia la columna, arrastrando la muestra.

3.2. IONIZACIÓN

A diferencia de lo que ocurre en GC-MS, en LC-MS los analitos llegan al espectrómetro de masas en estado líquido y acompañados por la fase móvil. Además lo hacen a una elevada presión, cuando los espectrómetros de masas funcionan en condiciones de alto vacío. Esto hace que el acoplamiento LC-MS sea más complejo que el GC-MS y, en un principio, limitó el número de aplicaciones analíticas de LC-MS. La aparición de las técnicas de ionización a presión atmosférica (*atmospheric pressure ionization*, API) a finales de los años 80 permitió la expansión del uso de LC-MS [33]. En este tipo de fuentes, la ionización de los analitos y la separación de las moléculas neutras, ya sea de manera mecánica o por fuerzas electrostáticas, ocurren al mismo tiempo. Las técnicas de ionización a presión atmosférica más extendidas son la ionización por electrospray, la ionización química a presión atmosférica y la fotoionización a presión atmosférica [34].

3.2.1. Ionización por electrospray

La ionización por electrospray (*electrospray ionization*, ESI) es, sin lugar a dudas, la fuente de ionización más utilizada para sustancias polares en un rango de masas moleculares amplio. Los componentes fundamentales de este tipo de fuentes son el nebulizador, que convierte el flujo de fase móvil en un *spray*, y la aguja, que es responsable de la ionización de los analitos. Para ello, esta aguja se mantiene a un potencial de varios kV respecto al capilar, que es el orificio de entrada al espectrómetro de masas, y transfiere electrones a la muestra, cuyo disolvente se va evaporando gracias a la aplicación de un gas caliente, normalmente nitrógeno. Cuando las fuerzas de repulsión entre las cargas de los iones contenidos en una gota superan a las de cohesión, se produce la desorción de los mismos en fase gas [35].

Las condiciones de ionización son tan suaves que, de manera general, se forman iones moleculares aunque, en función del potencial aplicado, se puede controlar la fragmentación de los mismos en la fuente.

3.2.2. Ionización química a presión atmosférica

En el caso de la ionización química a presión atmosférica (*atmospheric pressure chemical ionization*, APCI), el disolvente que llega a la fuente junto a los analitos se evapora y se ioniza gracias a una descarga de electrones generada en la aguja. A continuación, los iones formados a partir de la fase móvil reaccionan con los analitos, transfiriéndoles la carga. La eficacia de APCI se restringe a sustancias con peso molecular inferior a 1500 Da, siendo más efectiva para algunas familias de compuestos como los BUVSs estudiados en esta Tesis [10].

3.2.3. Fotoionización a presión atmosférica

La fotoionización a presión atmosférica (*atmospheric pressure photoionization*, APPI) tiene en común con la APCI que el eluyente es evaporado en primer lugar. La diferencia radica en el modo de ionizar los analitos, en lugar de utilizar una aguja cargada, se emplea una lámpara de descarga que emite en un rango de longitud de onda optimizado para favorecer la ionización [10].

En la **Figura II.C.6** se compara el rango de peso molecular y polaridad de los analitos ionizables mediante cada una de estas fuentes.

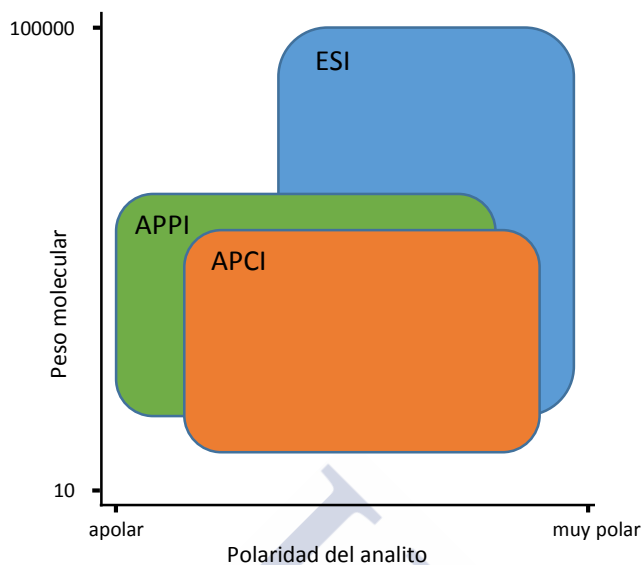


Figura II.C.6. Rango de peso molecular y polaridad de los analitos ionizables en fuentes ESI, APCI y APPI

3.3. APLICACIONES DE LC-MS A LA DETERMINACIÓN DE LAS SUSTANCIAS ESTUDIADAS

Para la determinación de benzotriazoles, dados los bajos niveles de concentración a medir, la baja volatilidad de estas sustancias y su elevada polaridad, la técnica escogida preferentemente durante los últimos años ha sido LC-MS/MS [36]. En la mayor parte de los casos se han utilizado triples cuadrupolos, alcanzándose LOQs del rango de los ng L^{-1} [37-41], aunque también se han publicado aplicaciones con analizadores de alta resolución, como el Orbitrap [42, 43]. En todos estos trabajos se han utilizado fuentes ESI.

Las grandes diferencias existentes, a nivel físico-químico, entre los benzotriazoles y sus derivados fenólicos hacen que normalmente se empleen equipos de GC-MS para el análisis de estos últimos. Sin embargo, también se encuentran aplicaciones de LC-MS y de LC-MS/MS para la determinación de BUVSs en la bibliografía. La dificultad añadida es que estos compuestos no ionizan fácilmente mediante ESI, por tanto, se utilizan fuentes de APPI [44] o de APCI [45]. Los LOQs alcanzados con cada una de estas fuentes se comparan con los obtenidos mediante GC en la **Tabla II.C.1.**

Tabla II.C.1. Comparación de los LOQs alcanzados en la determinación de BUVSs con fuentes APPI y APCI, así como mediante GC

Analitos	Muestra	Preparación de muestra	Análisis	Ionización	LOQ	Ref
UV-P UV-326 UV-327	4 g sedimento	PLE-QuEChERS	LC-MS/MS	APPI	14 ng g ⁻¹	[44]
UV-P UV-234 UV-320 UV-326 UV-327 UV-328 UV-329 UV-350	1 g lodo	PLE-SPE	LC-MS/MS	APCI	0.15-0.77 ng g ⁻¹	[45]
UV-P UV-320 UV-326 UV-327 UV-328	0.5 g sedimento	MSPD	GC-MS/MS	EI	3-15 ng g ⁻¹	[30]
UV-326 UV-329	1 g lodo	PLE	GC-MS/MS	EI	1.1-27.4 ng g ⁻¹	[27]

Tal y como ocurre con los benzotriazoles, los instrumentos analíticos más utilizados para la determinación de fármacos antimicóticos azólicos consisten en sistemas LC-MS/MS equipados con triples cuadrupolos [46-50], aunque también se han empleado trampas de iones [51] y analizadores híbridos QTOF de alta resolución [31], utilizándose en todos los casos fuentes ESI.

4. BIBLIOGRAFÍA

- [1] D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman, M.C.M. Gómez, Principios de Análisis Instrumental, McGraw-Hill, New York City, 2001.
- [2] D.C. Harris, Quantitative Chemical Analysis, Macmillan, London, 2010.
- [3] E. de Hoffmann, V. Stroobant, Mass Spectrometry: Principles and Applications, Wiley, New Jersey, 2007.
- [4] H. Kienitz, F. Aulinger, Massenspektrometrie, Wiley, New Jersey, 1968.
- [5] J.F.J. Todd, Mass Spectrometry Reviews 10 (1991) 3-52.
- [6] D.J. Douglas, A.J. Frank, D. Mao, Mass Spectrometry Reviews 24 (2005) 1-29.
- [7] A. Makarov, E. Denisov, A. Kholomeev, W. Balschun, O. Lange, K. Strupat, S. Horning, Analytical Chemistry 78 (2006) 2113-2120.
- [8] W. Stephens, American Physical Society 69 (1946) 691-691.
- [9] A.G. Marshall, C.L. Hendrickson, S.D.H. Shi, Analytical Chemistry 74 (2002) 252 A-259 A.
- [10] J.T. Watson, O.D. Sparkman, Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications, and Strategies for Data Interpretation, Wiley, New Jersey, 2013.
- [11] R. Cela, R.A. Lorenzo, M.C. Casais, Técnicas de Separación en Química Analítica, Síntesis, Madrid, 2002.
- [12] N.D. Danielson, P.A. Gallagher, J.J. Bao, Chemical Reagents and Derivatization Procedures in Drug Analysis, in: Encyclopedia of Analytical Chemistry, Wiley, New Jersey, 2006.
- [13] C. Schlett, B. Pfeifer, Vom Wasser 79 (1992) 65-65.
- [14] E. Hoh, K. Mastovska, Journal of Chromatography A 1186 (2008) 2-15.
- [15] M. García-López, I. Rodríguez, R. Cela, K.K. Kroening, J.A. Caruso, Talanta 79 (2009) 824-829.
- [16] F.W. McLafferty, Applied Spectroscopy 11 (1957) 148-156.
- [17] R.S. Gohlke, Analytical Chemistry 31 (1959) 535-541.
- [18] J.H. Gross, Mass Spectrometry: A Textbook, Springer, Berlin, 2006.
- [19] C. Domínguez, C. Reyes-Contreras, J.M. Bayona, Journal of Chromatography A 1230 (2012) 117-122.

- [20] E. Jover, V. Matamoros, J.M. Bayona, *Journal of Chromatography A* 1216 (2009) 4013-4019.
- [21] S.R. Corsi, S.W. Geis, J.E. Loyo-Rosales, C.P. Rice, R.I. Sheesley, G.G. Failey, D.A. Cancilla, *Environmental Science and Technology* 40 (2006) 3195-3202.
- [22] V. Matamoros, E. Jover, J.M. Bayona, *Analytical Chemistry* 82 (2010) 699-706.
- [23] M.G. Pervova, V.E. Kirichenko, V.I. Saloutin, *Journal of Analytical Chemistry* 65 (2010) 276-279.
- [24] Y. Kameda, K. Kimura, M. Miyazaki, *Environmental Pollution* 159 (2011) 1570-1576.
- [25] C.M. Reddy, J.G. Quinn, J.W. King, *Environmental Science and Technology* 34 (2000) 973-979.
- [26] Z. Zhang, N. Ren, Y.-F. Li, T. Kunisue, D. Gao, K. Kannan, *Environmental Science and Technology* 45 (2011) 3909-3916.
- [27] Y.S. Liu, G.G. Ying, A. Shareef, R.S. Kookana, *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 5328-5335.
- [28] I. Carpinteiro, B. Abuín, I. Rodríguez, R. Cela, M. Ramil, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397 (2010) 829-839.
- [29] I. Carpinteiro, B. Abuín, I. Rodríguez, M. Ramil, R. Cela, *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 3729-3735.
- [30] I. Carpinteiro, B. Abuín, M. Ramil, I. Rodríguez, R. Cela, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 402 (2012) 519-527.
- [31] M. Peschka, P. Roberts, T. Knepper, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389 (2007) 959-968.
- [32] M.W. Dong, *Modern HPLC for Practicing Scientists*, Wiley, New Jersey, 2006.
- [33] J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, C.M. Whitehouse, *Science* 246 (1989) 64-71.
- [34] W.M.A. Niessen, *Liquid Chromatography: Mass Spectrometry*, Taylor & Francis, London, 1998.
- [35] R.B. Cole, *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, and Applications*, Wiley, New Jersey, 1997.
- [36] S.D. Richardson, *Analytical Chemistry* 84 (2012) 747-778.
- [37] S. Weiss, T. Reemtsma, *Analytical Chemistry* 77 (2005) 7415-7420.

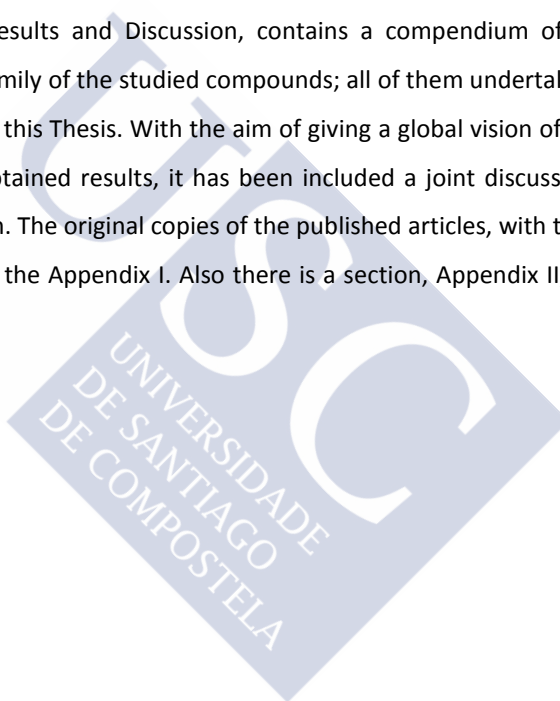
- [38] W. Giger, C. Schaffner, H.P. Kohler, *Environmental Science and Technology* 40 (2006) 7186-7192.
- [39] D. Voutsas, P. Hartmann, C. Schaffner, W. Giger, *Environmental Science and Pollution Research International* 13 (2006) 333-341.
- [40] I. Carpinteiro, B. Abuin, M. Ramil, I. Rodríguez, R. Cela, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 402 (2012) 2471-2478.
- [41] A.G. Asimakopoulos, A. Ajibola, K. Kannan, N.S. Thomaidis, *Science of The Total Environment* 452-453 (2013) 163-171.
- [42] J.A. van Leerdam, A.C. Hogenboom, M.M.E. van der Kooij, P. de Voogt, *International Journal of Mass Spectrometry* 282 (2009) 99-107.
- [43] F. Wode, C. Reilich, P. van Baar, U. Dünnebier, M. Jekel, T. Reemtsma, *Journal of Chromatography A* 1270 (2012) 118-126.
- [44] A.C. Chiaia-Hernández, M. Krauss, J. Hollender, *Environmental Science and Technology* 47 (2013) 976-986.
- [45] T. Ruan, R. Liu, Q. Fu, T. Wang, Y. Wang, S. Song, P. Wang, M. Teng, G. Jiang, *Environmental Science and Technology* 46 (2012) 2071-2079.
- [46] M. Kahle, I.J. Buerge, A. Hauser, M.D. Muller, T. Poiger, *Environmental Science and Technology* 42 (2008) 7193-7200.
- [47] A.I. García-Valcárcel, J.L. Tadeo, *Journal of Separation Science* 34 (2011) 1228-1235.
- [48] X. Peng, Q. Huang, K. Zhang, Y. Yu, Z. Wang, C. Wang, *Science of The Total Environment* 426 (2012) 311-317.
- [49] G. Chen, M. Hoptroff, X. Fei, Y. Su, H.-G. Janssen, *Journal of Chromatography A* 1317 (2013) 155-158.
- [50] Z.-F. Chen, G.-G. Ying, Y.-B. Ma, H.-J. Lai, F. Chen, C.-G. Pan, *Science of The Total Environment* 452-453 (2013) 377-383.
- [51] P.H. Roberts, K.V. Thomas, *Science of the Total Environment* 356 (2006) 143-153.

III. RESULTS AND DISCUSSION



As it has been explained in the Introduction, in this PhD dissertation it has been studied, from the point of view of the Analytical Chemistry, the fate and the behaviour of two groups of ECs with molecular structures based on azole rings, either imidazole or triazole, at sewage treatment plants. The first group is constituted by benzotriazoles and their phenol-derivatives, being the former corrosion inhibitors and the latter UV stabilizers, and the second group is a family of azole antimycotic pharmaceuticals. In both cases, we are talking about substances that are daily introduced in the urban wastewater and industrial sewage. These waters are transported towards STPs, where the hazardous substances, among them the studied ECs, should be eliminated, taking into account the eco-toxicological impact that they represent.

This section of Results and Discussion, contains a compendium of research papers corresponding to each family of the studied compounds; all of them undertaken and published during the drawing up of this Thesis. With the aim of giving a global vision of the experimental development and the obtained results, it has been included a joint discussion of the papers before each compendium. The original copies of the published articles, with the format of each journal, are contained in the Appendix I. Also there is a section, Appendix II, containing other published articles.





III. A. BENZOTRIAZOLES



The benzotriazoles studied in these papers can be split into two sub-families. One of them is the inhibitors of corrosion processes, which is formed by 1H-benzotriazole itself and its methyl- and chlorine-derivatives, and the other one is the UV stabilizers, constituted by a numerous group of 1H-benzotriazole phenol-derivatives. Despite the high structural similarity existing between these compounds, there are important differences in terms of physicochemical properties. While corrosion inhibitors are polar molecules that can move easily inside water, BUVSs are more lipophilic and, thus, they tend to adhere to suspended particulate matter and sediment in form of sludge during the water treatment process. Taking this into consideration, this Thesis proposes two methodologies for the determination of corrosion inhibitors in wastewater, useful to assess their concentration in an exact and reproducible way in treated and untreated sewage as well as in continental waters, and a robust analytical procedure for the evaluation of the presence and the concentration of BUVSs in primary and biological sewage sludge that sediments during the wastewater treatment and that are commonly used as fertilizers in agriculture.

The first developed work proposes a simple method, sample preparation takes only ten minutes, which does not involve a high cost, it saves in sorbents and organic solvent consumption as well as in the required instrumental, without losing quality on reproducibility and LOQs in comparison with more expensive proposals. It implicates the application of a microextraction technique, DLLME, which conditions are optimized within the work in order to obtain the maximum yield from this relatively new technique. It entails lower than usual sample volume, ten millilitres, and derivatization, which is performed while the extraction occurs, this is to say, the derivatization reaction does not imply an extra-stage. Analysis of the substances is executed in a single-quad GC-MS with electronic ionization, which is one of the most affordable hyphenated systems of mass spectrometry and provides with information-rich mass spectra that permits to differentiate easily between the analyte and the interferences.

Alternatively to this methodology, another analytical procedure for the determination of benzotriazoles is described in this Thesis. It involves a powerful analytical tool: the hybrid QTOF mass analyzer. The high resolution mass spectra provided by this instrument, together with the chance of doing tandem mass spectrometry experiments, allows the attainment of, primarily, the unambiguous empirical formula of the measured substance and, in the second place, structural information that must be coherent with the molecular formula. Therefore, a huge

advance is done at qualitative level, which permits the irrefutable identification of the measured compounds in target analysis. This avoids the inconvenient of derivatization and injection in GC, making possible the analysis of the extracts by LC-QTOF-MS with an ESI source. The optimized sample preparation protocol is based on SPME, but using a low-cost polymer material (PES) instead of expensive fibres. This sample preparation method is even more economic than the previous one, the cost in sorbent is 0.05 EUR per sample and the solvent consumption is minimum.

Lower LOQs are reached with the first one of the methods, although both procedures are useful for the determination of benzotriazoles in STPs influent and effluent, and also in surface water. This way, the benzotriazoles elimination yield during the sewage treatment could be estimated, being this rather limited, as well as the daily input of these compounds that takes place at an urban Spanish STP.

The analytical procedure developed for the determination of BUVSs in sewage sludge samples, which is also applicable to soil and sediments, implies a QTOF system too. In this case a GC-QTOF-MS instrument is used, as this family of compounds can be easily determine by GC. The extraction of analytes from solid matrixes is more difficult than from liquid ones, furthermore, sludge samples are extremely complex and contributes with important interferences. For these reasons, the application of this kind of systems is nearly mandatory and reduces drastically the uncertainty of the obtained results. For the sample extraction, a MSPD protocol was optimized, resulting in a good alternative to PLE, since it allows quantitative recoveries and, at the same time, it reduces the cost of the process maintaining a good robustness.

The achieved LOQs were between 2 and 10 ng g⁻¹; therefore, this methodology permitted the study of the fate of a selected group of eight BUVSs in real samples, being the summed concentrations of the ubiquitous compounds as high as 600 ng g⁻¹, referred to freeze-dried sludge samples.

ARTICLE III.A.1

**DETERMINATION OF BENZOTRIAZOLES IN WATER SAMPLES BY CONCURRENT
DERIVATIZATION-DISPERSIVE LIQUID-LIQUID MICROEXTRACTION FOLLOWED
BY GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY**

**Jorge Casado^a, Riccardo Nescatelli^b, Isaac Rodríguez^a, María Ramil^a, Federico
Marini^b, Rafael Cela^a**

^a Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Instituto de
Investigación y Análisis Alimentario, Universidad de Santiago de Compostela,
Constantino Candeira s/n, Santiago de Compostela 15782, Spain

^b Dipartimento di Chimica, Università degli Studi di Roma La Sapienza, Aldo
Moro 5, Roma 00185, Italy

Journal of Chromatography A 1336 (2014) 1-9

ISSN: 0021-9673

Elsevier, Amsterdam, The Netherlands

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.01.068>



ARTICLE III.A.2

**POLYETHERSULFONE SOLID-PHASE MICROEXTRACTION FOLLOWED BY
LIQUID CHROMATOGRAPHY QUADRUPOLE TIME-OF-FLIGHT MASS
SPECTROMETRY FOR BENZOTRIAZOLES DETERMINATION IN WATER SAMPLES**

Jorge Casado, Isaac Rodríguez, María Ramil, Rafael Cela

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Instituto de
Investigación y Análisis Alimentario, Universidad de Santiago de Compostela,
Constantino Candeira s/n, Santiago de Compostela 15782, Spain

Journal of Chromatography A 1299 (2013) 40-47

ISSN: 0021-9673

Elsevier, Amsterdam, The Netherlands

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.05.061>



ARTICLE III.A.3

**GAS CHROMATOGRAPHY QUADRUPOLE TIME-OF-FLIGHT MASS
SPECTROMETRY DETERMINATION OF BENZOTRIAZOLE ULTRAVIOLET
STABILIZERS IN SLUDGE SAMPLES**

Jorge Casado, Isaac Rodríguez, Inmaculada Carpinteiro, María Ramil, Rafael

Cela

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Instituto de
Investigación y Análisis Alimentario, Universidad de Santiago de Compostela,
Constantino Candeira s/n, Santiago de Compostela 15782, Spain

Journal of Chromatography A 1293 (2013) 126-132

ISSN: 0021-9673

Elsevier, Amsterdam, The Netherlands

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.03.050>



III. B. ANTIMYCOTIC DRUGS



The broad family of the antimycotic drugs comprises compounds with different properties. Some of them, such as fluconazole, have polar features and remain in the water media after the sewage treatment but others, like clotrimazole, have higher lipophilicity and, thus, can suffer adsorption processes and become a part of sewage sludge. Thus, analytical methodologies for this two kind of samples have been developed in this Thesis. In both cases, a LC-ESI-QTOF-MS instrument has been used mainly because of the high selectivity that this system provides, but also with the aim of testing the power of this kind of analyzer when performing post-target analysis, it is to say, the determination of compounds that were not initially pre-selected as analytes.

However, in addition to a high resolution analytical instrument, counting with a selective sample preparation protocol is crucial when dealing with such complex matrixes. Thus, a sample preparation strategy consisting of mixed-mode SPE with a sequential elution protocol was optimized for the isolation of the analytes from water samples. In the case of sludge samples the MSPD syringe, containing a PSA clean-up sorbent layer, was on-line connected to a cationic exchange SPE cartridge. This way, acids were retained by the PSA material and only positively charged compounds were keep at the SCX cartridge.

Both sample preparation methods rendered much better recoveries than the previous ones so far reported, reducing significantly the matrix effects that take place during the ionization at the ESI source. The LOQs ranged between 2 and 15 ng L⁻¹ for water and between 5 and 8 ng g⁻¹ in the case of sewage sludge. Fluconazole, ketoconazole, miconazole and clotrimazole were measured in wastewater samples at concentrations up to 200 ng L⁻¹, with fluconazole extant in treated water samples at a similar concentration than in raw wastewater; while clotrimazole, ketoconazole, miconazole and climbazole were ubiquitous in sludge samples with maximum average concentrations, above 400 ng g⁻¹, corresponding to clotrimazole. These results point to a general poor degradation of azole antimycotic pharmaceuticals during the sewage treatment, accompanied by the concentration of the most lipophilic analytes, clotrimazole, ketoconazole and miconazole, in the sludge.

As it was stated in the first paragraph and taking into account the high selectivity for basic nitrogenated compounds that the proposed sample preparation methodologies demonstrated, post-target analysis performance of the QTOF analyzer was applied to the identification of other

compounds with such features, susceptible of being present in the samples. Climbazole, another antimycotic drug, was found in all the analyzed wastewater samples, while amiodarone, amitriptyline and sertraline were ubiquitous in sludge samples, as well as, two of their metabolites: norsertraline and N-desethylamiodarone.

Considering the poor biodegradability presented by antimycotic drugs during the sewage treatment, degradation experiments were carried out aiming the assessment of the stability and the transformation paths followed by clotrimazole, ketoconazole and miconazole, by means of the identification of the generated transformation products, upon UV exposure, a possible wastewater tertiary treatment, and also trying to simulate phototransformation routes on agriculture fields amended with stabilized sludge from STPs. While quantification of the remaining concentration of these three compounds, after different reaction times, was performed in order to estimate the degradation kinetics of the process, non-target analysis of new compounds originated during the photolysis course was performed with the LC-QTOF-MS instrument. Reductive de-chlorination and intra-molecular cyclization were the most common reactions.

Aiming the accumulation of the parent substances and the generated transformation products, and their easy desorption to an organic solvent, silicone supports were loaded with the precursors prior to the direct exposure to 254 nm radiation. Results were compared with those obtained with solar radiation (365 nm), as well as, the outcome of the photolysis experiments undertaken on sand and real agricultural soil samples. Most of the compounds generated on the silicone supports matched with those obtained on these other matrices; and the kinetics of the photolysis reaction was much faster under 254 nm than under 365 nm. Finally, LC₅₀ estimations for the 48-h *Daphnia Magna* test were undertaken by means of a QSARs modelling software, resulting two transformation products of the clotrimazole and another one from the miconazole more toxic than their precursors.

ARTICLE III.B.1

**SELECTIVE DETERMINATION OF ANTIMYCOTIC DRUGS IN ENVIRONMENTAL
WATER SAMPLES BY MIXED-MODE SOLID-PHASE EXTRACTION AND LIQUID
CHROMATOGRAPHY QUADRUPOLE TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRY**

Jorge Casado, Isaac Rodríguez, María Ramil, Rafael Cela

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Instituto de
Investigación y Análisis Alimentario, Universidad de Santiago de Compostela,
Constantino Candeira s/n, Santiago de Compostela 15782, Spain

Journal of Chromatography A 1339 (2014) 42-49

ISSN: 0021-9673

Elsevier, Amsterdam, The Netherlands

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.02.087>



ARTICLE III.B.2

**SELECTIVE EXTRACTION OF ANTIMYCOTIC DRUGS FROM SLUDGE SAMPLES
USING MATRIX SOLID-PHASE DISPERSION FOLLOWED BY ON-LINE CLEAN-UP**

Jorge Casado, Gabriela Castro, Isaac Rodríguez, María Ramil, Rafael Cela

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Instituto de
Investigación y Análisis Alimentario, Universidad de Santiago de Compostela,
Constantino Candeira s/n, Santiago de Compostela 15782, Spain

Analytical and Bioanalytical Chemistry 407 (2015) 907-917

ISSN: 1618-2650

Springer, Berlin, Germany

DOI: [10.1007/s00216-014-8167-z](https://doi.org/10.1007/s00216-014-8167-z)



ARTICLE III.B.3

**IDENTIFICATION OF ANTIMYCOTIC DRUGS TRANSFORMATION PRODUCTS
UPON UV EXPOSURE**

Jorge Casado, Isaac Rodríguez, María Ramil, Rafael Cela

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Instituto de
Investigación y Análisis Alimentario, Universidad de Santiago de Compostela,
Constantino Candeira s/n, Santiago de Compostela 15782, Spain

Journal of Hazardous Materials 289 (2015) 72-82

ISSN: 0021-9673

Elsevier, Amsterdam, The Netherlands

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.02.031>



IV. CONCLUSIONS



This PhD dissertation presents the development of new analytical methodologies in order to research the fate and the behaviour of three groups of azole emerging pollutants: benzotriazole corrosion inhibitors, benzotriazole ultraviolet stabilizers and imidazole and triazole antimycotic drugs. Thus, studies on determination, distribution and transformation of some of the most common members of these three groups have been carried out. The focus has been given to the optimization of new miniaturized sample preparation strategies and the powerful analytical capabilities that state-of-the-art QTOF-MS hyphenated systems offer, being the most important the unambiguous identification of target and non-target compounds and the elucidation of the molecular structure of unknowns. The main conclusions derived from this work are outlined below.

A. BENZOTRIAZOLES CORROSION INHIBITORS AND BUVSs

Two methodologies for the determination of polar benzotriazoles in complex water samples (raw wastewater) have been developed, always with the idea of releasing new application strategies of trending microextraction techniques, which reduce the consumption of solvents and sorbents, and the application of new high-resolution, accurate MS systems.

One of these approaches consists of concurrent DLLME-derivatization followed by GC-MS analysis. In this work, it was demonstrated that simple and low-cost concurrent acetylation and microextraction processes, requiring just ten minutes, applied to these substances are achievable with good extraction yields. Besides, the combination of DLLME with an affordable GC-MS instrument render similar LOQs to those reported by classic sample preparation processes with more sophisticated analytical equipment, such as LC-MS/MS or GCxGC-MS, making possible important savings on lab investments. Another advantage of DLLME is that it requires a very low sample volume, in this case just ten millilitres, and a few microlitres of organic extractant solvent.

In the other procedure, an extraction process based on SPME using a small portion of technical grade polyethersulfone (1 cm – 0.05 EUR per analysis) accompany by LC-QTOF-MS analysis was development. In the optimization of these proceedings it was revealed that disposable PES polymer provides significantly higher extraction efficiencies than polydimethylsiloxane coated stir bars (Twister®) for these compounds; being the pH of the

sample and, in a lower extent, its ionic strength the main parameters that condition the extraction yields. On the other hand, recovery variations occur among different kinds of water samples, being possible their compensation by using BTri-d4 as internal surrogate. The last generation of ESI-QTOF-MS systems provides really high-selectivity determinations displaying a reasonable good sensitivity, even for low molecular mass compounds.

The LOQs achieved by both analytical methods are low enough to deal with wastewater and moderately polluted continental surface water. Data obtained are in agreement with previous studies, confirming the implication of urban STPs in the introduction of 1H-benzotriazole, 4-methyl-1H-benzotriazole and 5-methyl-1H-benzotriazole in the aquatic environment.

According to the measurements carried out on raw wastewater and treated wastewater samples, 1H-benzotriazole can be partially eliminated during the water treatment at a conventional STP, while 4-methyl-1H-benzotriazole and 5-methyl-1H-benzotriazole present a higher stability, with similar biodegradability efficiencies the both of them.

The benzotriazole UV stabilizers (aka Tinuvin[®]) are the hydroxyphenyl derivatives of benzotriazoles. Contrary to their precursors, these compounds are characterized by their high lipophilic behaviour; therefore, the novel analytical methodology that was proposed in this PhD dissertation for the determination of these chemicals was focused on sewage sludge, which is the solid waste generated during wastewater treatment. Again, the capabilities of a new-generation high-resolution QTOF-MS system were tested, coupled in this case to a gas chromatograph. An exhaustive sample preparation was accomplished by MSPD, which is one of the solid-sample extraction techniques that have gathered more attention in the last years. In the experiments that led to this analytical development it was observed that this single-step low-cost methodology provides relatively simple extracts from a really complex matrix as sewage sludge. This way, quantitative recoveries can be obtained, avoiding the purchase of expensive instrumental like accelerated solvent extractors (ASE).

At the same time, the EI-QTOF-MS instrument provides higher selectivity than the common EI-QqQ-MS systems, allowing the unambiguous identification of the target compounds by means of the acquisition of full product-ion accurate MS/MS spectra. This permitted the quantification of Tinuvin in one of the most complex environmental samples, with low enough

LOQs that permitted the confirmation of the role of sewage sludge as sink of these emerging contaminants at STPs. The highest concentrations correspond to UV-326 and UV-328, being them up to 170 ng g⁻¹ for the first one and 290 ng g⁻¹ for the second one.

B. ANTIMYCOTIC DRUGS

In the case of azole antimycotic pharmaceuticals, analytical methodologies for their determination in both, water and sludge, samples from STPs were developed, using in the two cases a LC-QTOF-MS instrument for the determination of the compounds in the extracts. As it was previously mentioned, the acquisition of full product-ion accurate MS/MS spectra permitted the unambiguous identification of these emerging contaminants.

In the particular case of water samples, a SPE procedure was optimized. The results obtained in this work proved that the combination of mixed-mode retention mechanisms with an advanced sequential desorption protocol significantly improves the selectivity of the process, avoiding the elution of interferences together with the analytes, with the consequent reduction on ESI signal attenuation effects. On the other hand, the high lipophilic character of antimycotic drugs favours their deposition and/or adsorption on the material used during sample preparation step. It is possible to avoid this drawback with acidification of samples and addition of methanol before filtration.

As regards sludge samples, the performance of MSPD was tested once again, in this occasion for the extraction of these antimycotic pharmaceuticals. In this case, MSPD was combined with an on-line cation-exchange clean-up strategy consisting of SPE. It was demonstrated that this sample preparation process is suitable for the selective extraction of the analytes, attaining a considerable reduction of matrix effects during ESI ionization in comparison with previous sample preparation approaches, and reducing the manipulation of sludge samples. It was also displayed that this sample preparation methodology can be extended to other basic drugs, containing triazole, imidazole or amine moieties, which can also be ubiquitous in sewage sludge.

These two analytical methodologies provided low enough LOQs to confirm that climbazole, clotrimazole, fluconazole, ketoconazole and miconazole were present in raw

IV. CONCLUSIONS

wastewater samples, being the fluconazole still extant at similar levels in treated wastewater. Additionally, climbazole, clotrimazole, ketoconazole and miconazole were found in sewage sludge, some of them at high concentrations. These results revealed that further wastewater treatments, like advanced oxidation processes, are required in order to eliminate the fluconazole, and that the rest of these drugs, which were apparently degraded at STPs (their concentrations in the treated wastewater were really low), are actually deposited and concentrated in the sewage sludge, with the consequent hazard that represents the application of this material as fertilizer in agriculture.

Post-target analysis capabilities of the employed hybrid QTOF-MS system were confirmed aiming the evaluation of the presence of non-target compounds. By processing the accurate mass spectral information previously acquired, it was possible to detect the presence of climbazole, an antimycotic drug that was not a target of this study, in wastewater, as well as amitriptyline, sertraline and amiodarone, and two of their metabolites, norsertraline and N-desethylamiodarone, in sewage sludge.

Once analytical methodologies for the determination of these compounds were optimized and the levels of antimycotic drugs in STP water and sludge were measured, the stability of clotrimazole, ketoconazole and miconazole under UV radiation, employed as tertiary wastewater treatment in some STPs and also present in sunlight, was explored. To this aim, technical grade silicone tubes were used as support, matching the generated transformation products with those formed in sand and agricultural soil upon UV exposure. Thus, the suitability of this material for this kind of experiments was confirmed. The identities of these transformation products were elucidated thanks to the non-target analysis capabilities owned by QTOF-MS systems. This way, the degradation pathways of these three drugs could be established, being reductive dechlorination and intramolecular cyclization, involving the imidazole ring, the most common transformation routes.

Obtained results showed that clotrimazole, ketoconazole and miconazole can be largely degraded upon UV exposure, with much faster removal kinetics under this kind of radiation (254 nm) than with sunlight (365 nm). It was also evidenced that degradation rates are matrix dependant, with increased stabilities when passing from silicone supports to sand and soil.

However, some of the identified transformation products might represent a more serious hazard than the precursor emerging pollutants.





APPENDIX I:
PUBLISHED ARTICLES



Following the recommendations established by the International School of Doctoral Programmes (Escuela de Doctorado Internacional) of the University of Santiago de Compostela, Appendix I compiles a full not-edited copy of all the articles included in this PhD dissertation.





ARTICLE III.A.1

**DETERMINATION OF BENZOTRIAZOLES IN WATER SAMPLES BY CONCURRENT
DERIVATIZATION-DISPERSIVE LIQUID-LIQUID MICROEXTRACTION FOLLOWED
BY GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY**

**Jorge Casado^a, Riccardo Nescatelli^b, Isaac Rodríguez^a, María Ramil^a, Federico
Marini^b, Rafael Cela^a**

^a Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Instituto de Investigación y Análisis Alimentario, Universidad de Santiago de Compostela, Constantino Candeira s/n, Santiago de Compostela 15782, Spain

^b Dipartimento di Chimica, Università degli Studi di Roma La Sapienza, Aldo Moro 5, Roma 00185, Italy

Journal of Chromatography A 1336 (2014) 1-9

ISSN: 0021-9673

Elsevier, Amsterdam, The Netherlands

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.01.068>



ARTICLE III.A.2**POLYETHERSULFONE SOLID-PHASE MICROEXTRACTION FOLLOWED BY
LIQUID CHROMATOGRAPHY QUADRUPOLE TIME-OF-FLIGHT MASS
SPECTROMETRY FOR BENZOTRIAZOLES DETERMINATION IN WATER SAMPLES****Jorge Casado, Isaac Rodríguez, María Ramil, Rafael Cela**

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Instituto de
Investigación y Análisis Alimentario, Universidad de Santiago de Compostela,
Constantino Candeira s/n, Santiago de Compostela 15782, Spain

Journal of Chromatography A 1299 (2013) 40-47

ISSN: 0021-9673

Elsevier, Amsterdam, The Netherlands

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.05.061>



ARTICLE III.A.3**GAS CHROMATOGRAPHY QUADRUPOLE TIME-OF-FLIGHT MASS
SPECTROMETRY DETERMINATION OF BENZOTRIAZOLE ULTRAVIOLET
STABILIZERS IN SLUDGE SAMPLES**

**Jorge Casado, Isaac Rodríguez, Inmaculada Carpinteiro, María Ramil, Rafael
Cela**

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Instituto de
Investigación y Análisis Alimentario, Universidad de Santiago de Compostela,
Constantino Candeira s/n, Santiago de Compostela 15782, Spain

Journal of Chromatography A 1293 (2013) 126-132

ISSN: 0021-9673

Elsevier, Amsterdam, The Netherlands

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.03.050>



ARTICLE III.B.1**SELECTIVE DETERMINATION OF ANTIMYCOTIC DRUGS IN ENVIRONMENTAL WATER SAMPLES BY MIXED-MODE SOLID-PHASE EXTRACTION AND LIQUID CHROMATOGRAPHY QUADRUPOLE TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRY**

Jorge Casado, Isaac Rodríguez, María Ramil, Rafael Cela

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Instituto de Investigación y Análisis Alimentario, Universidad de Santiago de Compostela, Constantino Candeira s/n, Santiago de Compostela 15782, Spain

Journal of Chromatography A 1339 (2014) 42-49

ISSN: 0021-9673

Elsevier, Amsterdam, The Netherlands

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.02.087>



ARTICLE III.B.2**SELECTIVE EXTRACTION OF ANTIMYCOTIC DRUGS FROM SLUDGE SAMPLES
USING MATRIX SOLID-PHASE DISPERSION FOLLOWED BY ON-LINE CLEAN-UP**

Jorge Casado, Gabriela Castro, Isaac Rodríguez, María Ramil, Rafael Cela

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Instituto de
Investigación y Análisis Alimentario, Universidad de Santiago de Compostela,
Constantino Candeira s/n, Santiago de Compostela 15782, Spain

Analytical and Bioanalytical Chemistry 407 (2015) 907-917

ISSN: 1618-2650

Springer, Berlin, Germany

DOI: [10.1007/s00216-014-8167-z](https://doi.org/10.1007/s00216-014-8167-z)



ARTICLE III.B.3**IDENTIFICATION OF ANTIMYCOTIC DRUGS TRANSFORMATION PRODUCTS
UPON UV EXPOSURE**

Jorge Casado, Isaac Rodríguez, María Ramil, Rafael Cela

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Instituto de Investigación y Análisis Alimentario, Universidad de Santiago de Compostela, Constantino Candeira s/n, Santiago de Compostela 15782, Spain

Journal of Hazardous Materials 289 (2015) 72-82

ISSN: 0021-9673

Elsevier, Amsterdam, The Netherlands

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.02.031>



**APPENDIX II:
OTHER PUBLISHED
ARTICLES**



**DETERMINATION OF CARDIAC DRUG AMIODARONE AND ITS N-DESETHYL
METABOLITE IN SLUDGE SAMPLES**

**Rosa Montes^{ab}, Isaac Rodríguez^a, Jorge Casado^a, María Carmen López-
Sabater^b, Rafael Cela^a**

^a Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Instituto de Investigación y Análisis Alimentario, Universidad de Santiago de Compostela, Constantino Candeira s/n, Santiago de Compostela 15782, Spain

^b Departamento de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, Barcelona 08028, Spain

Journal of Chromatography A 1394 (2015) 62-70

ISSN: 0021-9673

Elsevier, Amsterdam, The Netherlands

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2015.03.024>



En esta Tesis Doctoral se describe el desarrollo y la aplicación de nuevas estrategias de análisis útiles para la determinación de contaminantes emergentes azólicos en muestras medioambientales. Concretamente, las familias estudiadas son los benzotriazoles inhibidores de procesos de corrosión, los estabilizadores UV benzotriazólicos (Tinuvin), y los fármacos antimicóticos. Los métodos de análisis desarrollados consisten en una primera etapa de preparación de muestra mediante SPE, SPME o DLLME, para muestras líquidas, y MSPD, para muestras sólidas; seguida de una segunda etapa de determinación de las sustancias mediante LC-MS/MS o GC-MS/MS con analizador de masas híbrido cuadrupolo-tiempo de vuelo (QTOF) de última generación. La aplicación de estas metodologías ha permitido aportar datos sobre la distribución y estabilidad de estos contaminantes en el medio ambiente.

In this PhD dissertation the development and the application of new analytical strategies useful for the determination of azolic emerging contaminants in environmental samples are described. The studied families are the benzotriazole corrosion inhibitors, the benzotriazole UV stabilizers (Tinuvin) and the antimycotic pharmaceuticals. The developed analytical methods consist of a first stage of sample preparation by SPE, SPME or DLLME, for liquid samples, and MSPD, for solid samples; followed by a second stage of determination of the substances by LC-MS/MS or GC-MS/MS with the state-of-the-art quadrupole-time of flight (QTOF) mass analyzer. The application of these methodologies has permitted to provide data about distribution and stability of these contaminants in the environment.