



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Facultad de Química

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología

Instituto de Investigación y Análisis Alimentario

DESARROLLO DE METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA
DETERMINACIÓN DE TRICLOSÁN Y PARABENES.
APLICACIÓN AL ESTUDIO DE SU DISTRIBUCIÓN Y
TRANSFORMACIÓN EN MUESTRAS AMBIENTALES



M^a DEL PILAR CANOSA RODRÍGUEZ

Memoria para optar al grado de Doctora en Química

Santiago de Compostela, Octubre 2008

D. **Alberto Cepeda Sáez**, Catedrático de Universidad y Director del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela,

Informa:

Que la memoria titulada “DESARROLLO DE METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE TRICLOSÁN Y PARABENES. APLICACIÓN AL ESTUDIO DE SU DISTRIBUCIÓN Y TRANSFORMACIÓN EN MUESTRAS AMBIENTALES”, para optar al grado de Doctora en Química que presenta Dña. **María del Pilar Canosa Rodríguez**, ha sido realizada bajo la dirección de los Profesores Titulares D. **Isaac Rodríguez Pereiro** y Dña. **Elisa María Rubí Cano**, en el Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Facultad de Química de la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que así conste, firmo el presente informe en Santiago de Compostela, Octubre de 2008.

D. Alberto Cepeda Sáez

D. **Isaac Rodríguez Pereiro** y Dña. **Elisa María Rubí Cano**, Profesores Titulares del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela,

Autorizan:

A la licenciada Dña. **María del Pilar Canosa Rodríguez** la presentación de la memoria titulada “DESARROLLO DE METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE TRICLOSÁN Y PARABENES. APLICACIÓN AL ESTUDIO DE SU DISTRIBUCIÓN Y TRANSFORMACIÓN EN MUESTRAS AMBIENTALES”, que ha realizado bajo su dirección en el Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Facultad de Química de la Universidad de Santiago de Compostela, para optar al grado de Doctora en Química.

Y para que así conste, firmamos el presente informe en Santiago de Compostela, Octubre 2008.

D. Isaac Rodríguez Pereiro

Dña. Elisa M^a Rubí Cano

“Agradece a la llama su luz, pero no olvides el pie del candil que, constante y paciente, la sostiene en la sombra”. Rabindranath Tagore.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera mostrar mi gratitud en estas breves líneas a aquellos que han hecho posible esta Tesis Doctoral.

Agradecer al Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología y al Instituto de Investigación y Análisis Alimentario, así como a D. Rafael Cela Torrijos, director del grupo de investigación de Cromatografía y Quimiometría del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela, los medios proporcionados para la realización de este trabajo. Asimismo, al Gobierno de España, la Xunta de Galicia y fondos FEDER (proyectos DGICT CTQ2006-03334 y PGIDIT06PXIB237039PR), y al Ministerio de Ciencia e Innovación por la beca FPU disfrutada durante la realización de esta Tesis Doctoral.

Mi más sincero agradecimiento a D. Isaac Rodríguez Pereiro y Dña. Elisa Rubí Cano, directores de este trabajo. Gracias Isaac por tu paciencia, tu apoyo y los conocimientos compartidos. A Elisa, tus ánimos, tu ayuda incondicional y las largas charlas en épocas de desánimo.

Gracias también a mis compañeros del IIAA, a los que ya no están, a los que siguen estando y a los que acaban de llegar. Agradecer especialmente a aquellos que han contribuido de algún modo en la realización de este trabajo.

A Dña. María Teresa Tena Vázquez de la Torre, profesora titular del departamento de Química Analítica de la Universidad de La Rioja, por facilitarme la estancia en su grupo de investigación durante el periodo Septiembre-Diciembre de 2006. Gracias Teresa por tus sabios consejos y por hacerme ver que las cosas, tarde o temprano, siempre se ven recompensadas.

Especial mención a los chicos del laboratorio 5, por su cariño y su amistad, por las noches de la Laurel, y por arrancarme una sonrisa en los momentos de “morriña”.

A mi familia, amigos, y en especial a Nacho por su comprensión y apoyo durante este largo periodo, a ellos va dedicada especialmente esta Tesis.

A mi familia

A Nacho

ÍNDICE

ÍNDICE

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	1
CAPÍTULO I.....	5
I. TRICLOSÁN Y COMPUESTOS RELACIONADOS.....	7
1.1. Definición, estructura y propiedades del triclosán y compuestos relacionados.....	7
1.2. Aplicaciones.....	8
1.3. Toxicidad.....	9
1.4. Distribución en el medio ambiente.....	11
1.5. Productos de transformación del triclosán.....	17
1.5.1. Closanos policlorados y clorofenoles.....	17
1.5.2. Dioxinas.....	18
1.5.3. Metiltriclosán.....	20
II. PARABENES.....	21
2.1. Definición, estructura y propiedades de los parabenes.....	21
2.2. Aplicaciones.....	22
2.3. Toxicidad.....	23
2.4. Distribución en el medio ambiente.....	24
2.5. Productos de transformación de los parabenes.....	26
2.5.1. Ácido p-hidroxibenzoico.....	26
2.5.2. Productos de halogenación.....	26
III. METODOLOGÍA ANALÍTICA.....	27
3.1. Preparación de muestra para matrices acuosas.....	27
3.1.1. Extracción líquido-líquido (LLE).....	27
3.1.2. Extracción en fase sólida (SPE).....	28
3.1.3. Microextracción en fase sólida (SPME).....	31
3.2. Preparación de muestra para matrices sólidas.....	36

3.2.1. Extracción asistida por microondas (MAE).....	36
3.2.2. Extracción Soxhlet.....	38
3.2.3. Dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD).....	39
3.2.4. Extracción con disolventes presurizados (PLE).....	40
3.2.5. Ultrasonidos (US).....	42
3.3. Derivatización.....	43
3.3.1. Derivatización en medio homogéneo.....	43
3.3.2. Derivatización combinada con SPME.....	45
3.3.3. Uso de agentes sililantes como reactivos de derivatización.....	46
3.4. Determinación.....	48
3.4.1. Cromatografía de gases.....	48
3.4.2. Cromatografía de líquidos.....	50
CAPÍTULO II.....	53
I. MEDIOS EXPERIMENTALES GENERALES.....	55
1.1. Compuestos y materiales utilizados.....	55
1.1.1. Reactivos y disolventes.....	55
1.1.2. Patrones.....	55
1.1.3. Adsorbentes para SPE y fibras de SPME.....	56
1.2. Instrumentación.....	56
1.2.1. Material general de laboratorio.....	56
1.2.2. Equipos de extracción utilizados.....	57
1.2.3. Programas informáticos.....	57
1.2.4. Sistemas GC-MS.....	57
1.3. Preparación de patrones.....	58
II. METODOLOGÍA DESARROLLADA.....	59
2.1. Protocolos de preparación de muestra.....	59

2.1.1. Determinación de triclosán y sus derivados en muestras acuosas mediante extracción en fase sólida.....	59
2.1.2. Determinación de triclosán y sus derivados en muestras acuosas mediante microextracción en fase sólida.....	60
2.1.3. Determinación de derivados del ácido parahidroxibenzoico en muestras de agua mediante extracción en fase sólida.....	61
2.1.4. Determinación de metilparaben, etilparaben, propilparaben, butilparaben y bencilparaben en muestras acuosas mediante microextracción en fase sólida....	62
2.1.5. Determinación de triclosán y clorofenoles relacionados en muestras de sedimentos y lodos de depuradora mediante extracción asistida por microondas.	63
2.1.6. Extracción conjunta de triclosán, metil-, etil-, propil- y butilparaben en muestras de polvo mediante extracción con disolventes presurizados.....	64
2.1.7. Extracción conjunta de triclosán, metil-, etil-, propil- y butilparaben en muestras de polvo mediante dispersión de la matriz en fase sólida.....	65
2.1.8. Determinación de triclosán y metiltriclosán en material biológico mediante MSPD.....	66
2.2. Condiciones de determinación.....	67
2.2.1. GC-MS.....	67
2.2.2. GC-MS/MS.....	68
CAPÍTULO III.....	71
I. DETERMINACIÓN DE TRICLOSÁN Y SUS DERIVADOS EN AGUA MEDIANTE MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.....	73
1.1. Introducción.....	73
1.2. Experimentos previos.....	74
1.2.1. Identificación cromatográfica.....	74
1.2.2. Evaluación de la viabilidad del muestreo mediante SPME con derivatización on-fiber.....	77
1.3. Optimización del proceso de SPME con derivatización on-fiber.....	78

1.3.1. Modo de muestreo.....	78
1.3.2. Comparativa de distintas fases.....	79
1.3.3. Optimización de las condiciones de muestreo con poliacrilato y PDMS-DVB: Influencia de la agitación, fuerza iónica del medio y pH.....	81
1.3.4. Volumen de muestra.....	83
1.3.5. Tiempo de extracción.....	84
1.3.6. Optimización de las condiciones de derivatización.....	86
1.3.7. Evaluación de los efectos memoria.....	89
1.3.8. Efectos de matriz.....	90
1.4. Caracterización del método analítico.....	91
1.4.1. Linealidad.....	91
1.4.2. Límites de cuantificación.....	92
1.4.3. Repetibilidad del proceso.....	93
1.4.4. Exactitud del método de SPME.....	93
II. DETERMINACIÓN DE PARABENES EN AGUA MEDIANTE MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.....	95
2.1. Introducción.....	95
2.2. Experimentos previos.....	95
2.2.1. Elección del agente sililante y estudios preliminares de repetibilidad.....	95
2.2.2. Identificación cromatográfica.....	98
2.3. Optimización del proceso de SPME con derivatización on-fiber.....	100
2.3.1. Recubrimiento de la fibra de SPME.....	100
2.3.2. Fuerza iónica del medio.....	101
2.3.3. pH y volumen de muestra.....	102
2.3.4. Modo de muestreo y agitación.....	104
2.3.5. Tiempo de extracción.....	105
2.3.6. Optimización de las condiciones de derivatización on-fiber.....	106

2.3.7. Evaluación de los efectos memoria.....	108
2.3.8. Efectos de matriz.....	109
2.4. Caracterización analítica del método propuesto.....	110
2.4.1. Linealidad.....	110
2.4.2. Límites de cuantificación del método.....	111
2.4.3. Repetibilidad del método.....	112
2.4.4. Exactitud del proceso de SPME.....	113
III. ESTUDIO DE LA FORMACIÓN DE DERIVADOS HALOGENADOS DEL TRICLOSÁN Y PARABENES EN AGUA CLORADA.....	115
3.1. Introducción.....	115
3.1.1. Antecedentes bibliográficos.....	115
3.1.2. Concentración de las muestras.....	118
3.1.3. Preparación de la muestra para el estudio de halogenación.....	121
3.1.4. Medida del cloro libre en aguas de grifo.....	121
3.1.5. Valoración de la disolución de hipoclorito.....	121
3.1.6. Cálculo del tiempo de vida media.....	122
3.2. Condiciones instrumentales de medida.....	123
3.3. Extracción en fase sólida con derivatización en medio homogéneo de triclosán y compuestos relacionados.....	128
3.3.1. Optimización de las condiciones de derivatización en medio homogéneo y estabilidad de los compuestos sililados.....	128
3.3.2. Optimización del proceso de SPE para muestras acuosas.....	130
3.3.2.1. Volumen de elución y volumen de corte.....	130
3.3.2.2. Matrices complejas: filtración y purificación de extractos.....	132
3.3.3. Caracterización del método analítico.....	134
3.3.3.1. Caracterización del método de determinación (GC-MS): linealidad, repetibilidad y límites de cuantificación.....	135

3.3.3.2. Exactitud, precisión y límites de cuantificación del método analítico.....	135
3.4. Extracción en fase sólida con derivatización en medio homogéneo para la determinación de parabenos en muestras de agua.....	137
3.4.1. Optimización de las condiciones de derivatización en medio homogéneo y estabilidad de los compuestos sililados.....	137
3.4.2. Optimización del proceso de SPE para muestras acuosas.....	139
3.4.2.1. Volumen de elución de los cartuchos y volumen de corte.....	140
3.4.2.2. Matrices complejas: Purificación de los extractos.....	140
3.4.3. Caracterización del método analítico.....	141
3.4.3.1. Caracterización del método de determinación (GC-MS): linealidad, repetibilidad y límites de cuantificación instrumentales.....	142
3.4.3.2. Exactitud, precisión y límites de cuantificación del método analítico.....	143
3.5. Halogenación del triclosán.....	145
3.5.1. Pruebas preliminares.....	145
3.5.2. Estudio de degradación a distintos pHs y concentraciones de cloro libre.....	146
3.5.3. Cinéticas de cloración en agua ultrapura.....	147
3.5.4. Identificación de los productos de transformación.....	148
3.5.5. Evolución temporal de los productos mayoritarios.....	153
3.5.6. Estudios de cloración en agua de grifo.....	156
3.5.7. Presencia de compuestos halogenados en muestras reales.....	157
3.6. Halogenación de parabenos.....	159
3.6.1. Pruebas preliminares.....	159
3.6.2. Degradación a distintos pHs y concentraciones de cloro libre en agua ultrapura.....	159
3.6.3. Cinéticas de halogenación en agua ultrapura y agua de grifo.....	160
3.6.4. Identificación de los productos de transformación: Parabenos clorados y Bromados.....	162
3.6.5. Evolución temporal de los derivados clorados de los parabenos.....	170

3.6.6. Formación de derivados halogenados de los parabenes en agua de grifo en contacto con productos de cuidado personal.....	172
3.6.7. Presencia de parabenes halogenados en muestras reales.....	174
IV. APLICACIÓN DE LAS METODOLOGÍAS DESARROLLADAS A LA DETERMINACIÓN DE TRICLOSÁN, COMPUESTOS RELACIONADOS Y PARABENES EN AGUAS RESIDUALES Y SUPERFICIALES.....	177
4.1. Triclosán y compuestos relacionados.....	177
4.2. Parabenes.....	182
Anexo.....	187
CAPÍTULO IV.....	189
I. DETERMINACIÓN DE TRICLOSÁN Y CLOROFENOLES EN MUESTRAS DE SEDIMENTO Y LODO MEDIANTE EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS.....	191
1.1. Introducción.....	191
1.2. Experimentos previos.....	193
1.2.1. Viabilidad de la extracción de TCS, 2,4-DCF y 2,4,6-TCF de muestras de lodos mediante MAE.....	193
1.2.2. Identificación cromatográfica (GC-MS/MS).....	195
1.3. Estrategia de purificación de los extractos.....	197
1.4. Optimización de las condiciones de extracción asistida por microondas.....	200
1.4.1. Temperatura, disolvente, volumen de disolvente y agitación.....	200
1.4.2. Optimización del volumen de extractante, proporción metanol:acetona y modificador orgánico.....	202
1.5. Caracterización del método analítico.....	205
1.5.1. Caracterización del método de determinación (GC-MS/MS): linealidad, repetibilidad y LOQs.....	205
1.5.2. Exactitud, precisión y límites de cuantificación del método analítico.....	206
1.6. Aplicación al análisis de muestras reales.....	209

CAPÍTULO V.....	211
I. DETERMINACIÓN CONJUNTA DE TRICLOSÁN Y PARABENES EN MUESTRAS DE POLVO.....	213
1.1. Introducción.....	213
1.2. Condiciones experimentales de medida.....	215
1.3. Extracción con disolventes presurizados.....	216
1.3.1. Estrategia de purificación.....	216
1.3.2. Optimización de las condiciones de extracción.....	220
1.3.2.1. Disolvente de extracción.....	220
1.3.2.2. Temperatura, tiempo y masa de co-adsorbente.....	221
1.3.2.3. Ciclos de extracción.....	225
1.3.3. Optimización de las condiciones de derivatización.....	226
1.3.4. Caracterización del método analítico.....	227
1.3.4.1. Caracterización del método de determinación (GC-MS/MS): linealidad, repetibilidad y LOQs.....	228
1.3.4.2. Exactitud, precisión y límites de cuantificación del método analítico.....	229
1.4. Extracción mediante dispersión de la matriz en fase sólida.....	231
1.4.1. Optimización de las condiciones de extracción.....	231
1.4.1.1. Elección del co-adsorbente.....	231
1.4.1.2. Disolvente de elución.....	232
1.4.1.3. Optimización de la masa de dispersante, disolvente de elución y Volumen.....	234
1.4.1.4. Masa de co-adsorbente y volúmenes de disolventes de lavado y elución..	236
1.4.2. Optimización de las condiciones de derivatización en acetonitrilo.....	238
1.4.3. Caracterización del método analítico.....	240
1.4.3.1. Caracterización del método de determinación (GC-MS/MS): linealidad, repetibilidad y LOQs.....	240
1.4.3.2. Exactitud, precisión y límites de cuantificación del método.....	241

1.5. Análisis de muestras reales.....	243
CAPÍTULO VI.....	245
I. DETERMINACIÓN DE TRICLOSÁN Y METILTRICLOSÁN EN MUESTRAS DE MATERIAL BIOLÓGICO.....	247
1.1. Introducción.....	247
1.1.1. Antecedentes bibliográficos.....	247
1.1.2. Determinación de contenido graso de las muestras. Método Bligh & Dyer..	250
1.1.3. Condiciones instrumentales de medida.....	251
1.2. MSPD con retención de lípidos.....	253
1.3. MSPD con eliminación de lípidos.....	257
1.3.1. Porcentaje de ácido sulfúrico en el co-adsorbente.....	258
1.3.2. Tipo y volumen de extractante.....	259
1.3.3. Estabilidad de TCS y MTCS en las muestras con adición.....	260
1.4. Caracterización del método analítico.....	261
1.4.1. Caracterización del método de determinación (GC-MS/MS): linealidad, repetibilidad y LOQs.....	262
1.4.2. Exactitud, precisión y límites de cuantificación del método analítico.....	262
1.5. Aplicación de la metodología desarrollada.....	264
CONCLUSIONES.....	267
BIBLIOGRAFÍA.....	273
ACRÓNIMOS.....	287



JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Hasta mediados de los años 90, un número creciente de compuestos orgánicos con elevada toxicidad, muy estables químicamente y con carácter bioacumulativo, como los PCBs, dioxinas, diversos pesticidas, etc, fueron incluidos en las listas de contaminantes orgánicos persistentes (POPs) y sometidos a intensos programas de monitorización, a la vez que se desarrollaron las distintas legislaciones en referencia a los niveles máximos emitidos y permitidos en el medio acuático.

A partir de este momento, en los estudios medioambientales, se ha empezado a considerar otro tipo de sustancias, denominados contaminantes emergentes, como son los productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCPs) [Loos R; 2003][Petrović M; 2003]. Un contaminante emergente corresponde, en muchos casos, a un compuesto no regulado, el cual es un futuro candidato para una posterior regulación, dependiendo de sus efectos potenciales sobre la salud y el medio ambiente [Barceló D; 2003]. Los productos de cuidado personal incluyen un amplio número de compuestos, como, por ejemplo, fármacos, esteroides y hormonas, fragancias, estabilizantes, antisépticos,... La característica principal de estos compuestos es que no precisan ser persistentes en el medio ambiente para ejercer efectos negativos, ya que su continua descarga, compensa la eliminación y transformación de los mismos. La introducción de PPCPs en el medio ambiente proviene de distintas vías:

- Descargas de aguas residuales (tratadas y no tratadas) en ríos y mares.
- Fármacos excretados sin metabolizar.
- Jabones, desinfectantes, etc, que se vierten directamente a los ríos y mares [Kanda R; 2003][Agüera A; 2003][Arnold WA; 2003].
- Empleo de aerosoles y otros preparados en actividades cotidianas de aseo y limpieza del hogar.

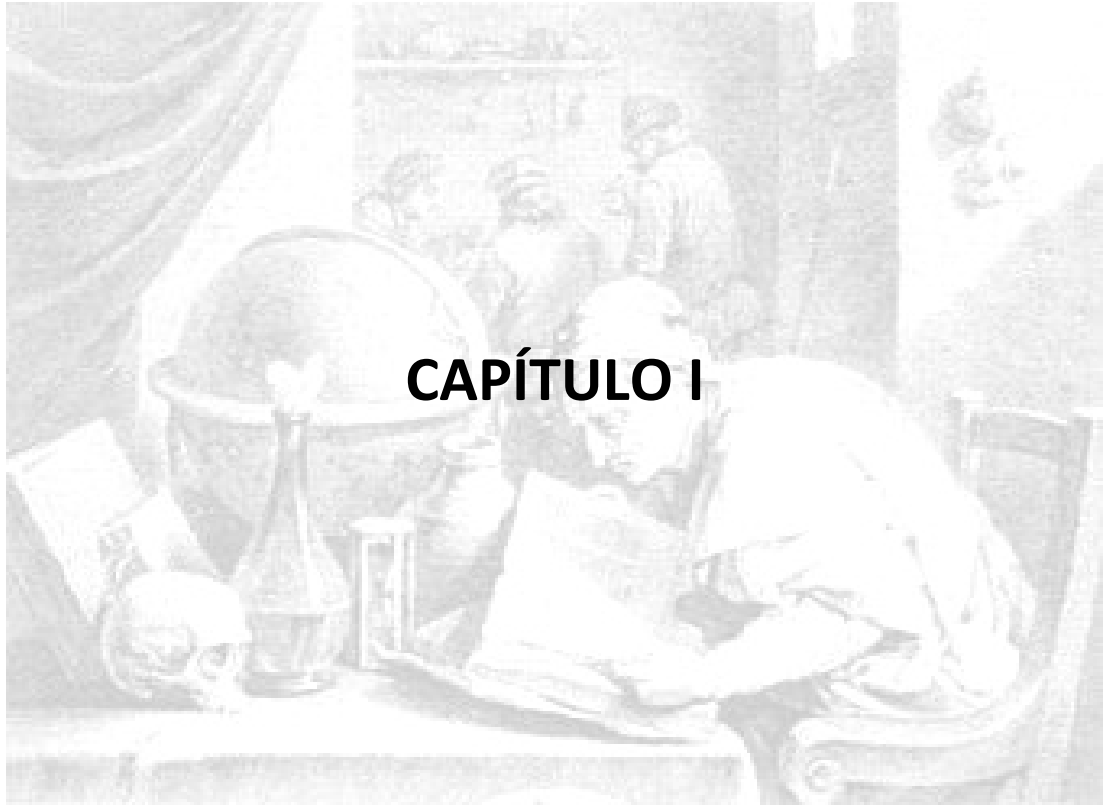
En la mayoría de los casos, la toxicidad de estos compuestos es baja, sin embargo pueden ser precursores de otras especies, considerados contaminantes prioritarios, como por ejemplo las dibenzo-*p*-dioxinas policloradas o sustancias cloradas aromáticas [Arnold WA; 2003][Hell K; 2000][Tixier C; 2002]. Además, la presencia constante de antibióticos, fármacos, bactericidas, etc, en el medio ambiente ha provocado el desarrollo de cepas bacterianas resistentes a dichos agentes, malformaciones de los órganos sexuales en animales, cambio de sexo en los peces y descenso de fertilidad en humanos [<http://www.ayaba.es/diario>]. Incluso algunos autores han puesto de manifiesto la posible relación entre ciertos tipos de cáncer y el uso de estos compuestos en productos de cuidado personal [Darbre PD; 2004].

La continua introducción de estas sustancias, aparentemente inocuas, así como los escasos controles medioambientales de las mismas, hace necesario el desarrollo de una serie de metodologías analíticas que permitan obtener datos respecto a su distribución medioambiental, así como el riesgo potencial, a largo plazo, derivado de su uso cotidiano en nuestros hogares. De este modo, es posible establecer la necesidad de desarrollar, o no, una legislación encaminada al control de estas sustancias, aparentemente inofensivas por contacto dérmico o por ingestión, así como de los subproductos generados a partir de las mismas mediante reacciones fotoquímicas u oxidativas.

En este trabajo se han desarrollado distintos métodos analíticos, aplicados a matrices medioambientales, para la determinación de un bactericida de amplio uso, el Triclosán, así como clorofenoles relacionados (2,4-diclorofenol, 2,3,4-triclorofenol, 2,4,6-triclorofenol) **[Kanetoshi A; 1987][Canosa P; 2005 A]**, un producto de biometilación del mismo, el metiltriclosán **[Balmer ME; 2005]**, y por último, una familia de compuestos utilizados como conservantes, los parabenos (metilparaben, etilparaben, propilparaben, butilparaben y bencilparaben) **[Benijts T; 2004]**.

Agua, lodo, polvo de atmósferas interiores y músculo de pescado han sido seleccionados como matrices, para evaluar su distribución en el medio ambiente. En general, se ha optado por optimizar metodologías de preparación de muestra sencillas y de bajo coste, como son la extracción en fase sólida, la microextracción en fase sólida y la dispersión de matriz en fase sólida. Además, se han utilizado la extracción asistida por microondas y la extracción acelerada con disolventes en varias aplicaciones.

Adicionalmente al desarrollo de metodologías de determinación de estos compuestos, se han llevado a cabo diversos estudios en lo referente a su transformación química en aguas cloradas y la posibilidad de migración del Triclosán desde superficies tratadas con este bactericida a alimentos en contacto con las mismas.



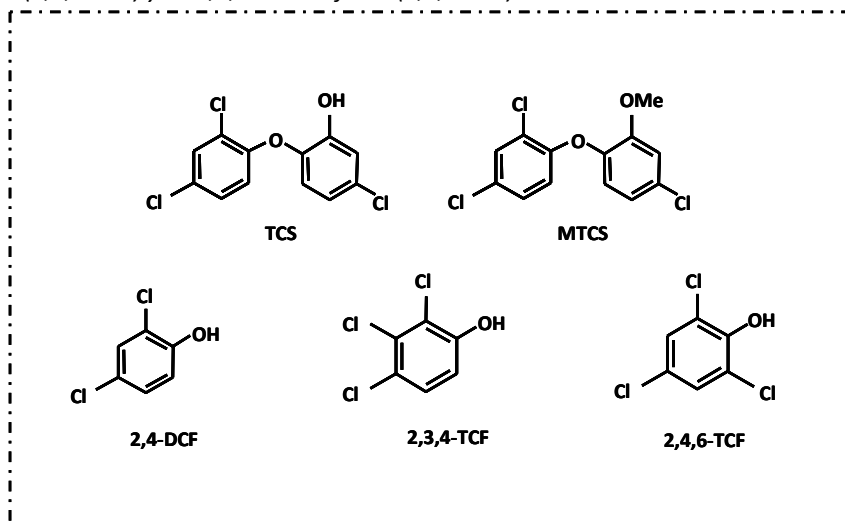
CAPÍTULO I

I. TRICLOSÁN Y COMPUESTOS RELACIONADOS

1.1. Definición, estructura y propiedades del triclosán y compuestos relacionados

El triclosán [5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxy)fenol], TCS, es un fenoxifenol triclorado comercializado con el nombre de *Irgacare MP* o *Irgasan DP 300* que presenta propiedades antibacterianas. Es un polvo blanquecino escasamente soluble en agua, hidrolíticamente estable y poco volátil, con una elevada hidrofobicidad. Debido a su reactividad, se estudiará conjuntamente con varios de sus productos de transformación: el metiltriclosán, el 2,4-diclorofenol, el 2,3,4-triclorofenol y el 2,4,6-triclorofenol, los cuales se muestran en la figura I.1.

Figura I.1. Estructuras del triclosán (TCS), metiltriclosán (MTCS), 2,4-diclorofenol (2,4-DCF), 2,3,4-triclorofenol (2,3,4-TCF) y el 2,4,6-triclorofenol (2,4,6-TCF).



El metiltriclosán [5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxy)anisol], MTCS, es un anisol generado en procesos de biometilación del triclosán, cuyas propiedades físico-químicas le proporcionan carácter bioacumulativo [Balmer ME; 2005]. Los clorofenoles anteriores se consideran posibles productos de hidrólisis del triclosán en medio acuoso. El 2,4-diclorofenol (2,4-DCF) y el 2,3,4-triclorofenol (2,3,4-TCF) fueron propuestos inicialmente como subproductos de hidrólisis [Onodera S; 1987], aunque estudios posteriores, pusieron de manifiesto que son el 2,4,6-triclorofenol (2,4,6-TCF) junto con el 2,4-diclorofenol los productos finales generados en reacciones de oxidación e hidrólisis del triclosán [Rule KL; 2005][Canosa P; 2005 A].

En la tabla I.1, se muestran algunas de las propiedades descritas para estos compuestos.

Tabla I.1. Propiedades del triclosán y compuestos relacionados.

Propiedades	TCS	MTCS	2,4-DCF	2,3,4-TCF	2,4,6-TCF
<i>P_m</i> (g/mol)	289.5	303.6	163	197.4	197.4
<i>pK_a</i>	7.80	---	8.05	7.10	6.59
<i>Log K_{ow}</i>	4.8	5.4	2.99	3.66	3.57
Punto ebullición (°C)	345	359	210	260	246
Punto fusión (°C)	162	128	113	111	96
<i>P vapor</i> (Torr)	3.26 10 ⁻⁵	5.18 10 ⁻⁵	0.136	0.008	0.0177
Solubilidad, pH 3 (g/L)	0.004	0.001	3.6	0.79	0.87
Solubilidad, pH 7 (g/L)	0.005	0.001	3.9	1.4	3.2
Solubilidad, pH 9 (g/L)	0.069	0.001	36	61	190

1.2. Aplicaciones

El triclosán exhibe un amplio espectro bactericida contra las bacterias Gram + y Gram -, además de hongos y levaduras. Su efecto antibacteriano es debido a la inhibición que ejerce sobre la *proteína transportadora enoil-acil reductasa* (ENR), encargada de la biosíntesis de ácidos grasos necesarios para la formación de las paredes celulares y la reproducción de las bacterias [Singer H; 2002][Mc Avoy D; 2002][Glaser A; 2004].

El triclosán está presente en múltiples productos relacionados con la desinfección en un rango que va desde 0.1 a 0.3 % (1000-3000 µg/g), como jabones, desodorantes, limpiadores, champús y cosméticos [http://www.listadeespera.net/guia/pdf/RD1599_1997_17oct.pdf]. Además, es adecuado para su introducción en polímeros y fibras, en almohadillas de colchón, tableros de corte, zapatos y ropa deportiva [Orvos DR; 2000][Birkel M; 1993][Glaser A; 2004]. Para los polímeros y tejidos, contenidos de triclosán (Microban®) de 300 µg/g ofrecen protección contra las bacterias Gram +, 750-1000 µg/g frente a bacterias Gram + y -, 300-5000 µg/g protección adicional al desarrollo de hongos; con 4000 µg/g es posible mantener las propiedades antibacterianas en aquellos productos que son lavados con frecuencia [Gacén J; 2001]. Su uso más conocido es como aditivo en dentífricos, ya que se considera un agente activo contra la gingivitis, ejerciendo esta acción a concentraciones superiores a 0.05-0.06 mM (14-17 µg/g) [Zuckerbraum HL; 1998].

1.3. Toxicidad

El triclosán es un compuesto de baja toxicidad aguda. Diversos estudios sobre su uso en productos de cuidado personal revelan que, a las concentraciones utilizadas (0.3 %, según RD 1599 del 17 octubre 1997), no es tóxico, carcinogénico, teratogénico, ni irritante de ojos y piel. El triclosán penetra en el cuerpo humano por contacto con la piel, las mucosas y el tracto intestinal, reduciéndose su concentración a la mitad tras 21 horas, retornando finalmente a los niveles iniciales al cabo de 8 días [Mc Avoy D; 2002][Allmyr M; 2006 A].

El mayor problema derivado de la introducción de triclosán en las formulaciones de productos de cuidado personal es su continua descarga en el medio ambiente, ya que puede producir efectos adversos sobre la flora y fauna acuática. Las algas, organismos unicelulares y peces han sido los principales organismos en los que se ha estudiado su toxicidad.

Dado que las algas comprenden el primer escalón en la pirámide alimentaria, un efecto adverso en ellas puede desembocar en un efecto en cadena para organismos de mayor tamaño [Shipper O; 2003]. Las algas unicelulares, particularmente las algas verdes y las cianobacterias, son del orden de 30 a 80 veces más sensibles a la exposición a triclosán que otros organismos acuáticos [Tatarazako N; 2004][Orvos DR; 2002]. El crecimiento de estas algas es inhibido a concentraciones de TCS comprendidas entre 1.3 y 13 ng/mL en un tiempo de exposición de 4 días, con una concentración media inhibitoria, conocida como IC₅₀, de 4.7 ng/mL. Un estudio realizado por Orvos y colaboradores [Orvos DR; 2002] mostró que al disminuir la concentración de triclosán, el crecimiento de las algas se reanudaba, sugiriendo que los organismos se encuentran en un estado latente. Así mismo, descubrieron que el mayor efecto tóxico se produjo sobre la especie *Scenedesmus Subspicatus*, dado que este organismo es capaz de transformar químicamente el triclosán en 2,4-diclorofenol, de mayor toxicidad que el compuesto de partida.

Bioensayos realizados por Wilson y colaboradores [Wilson BA; 2003] sugirieron que la estructura y función de las comunidades de algas pueden experimentar modificaciones cuando sufren continuas descargas de efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales conteniendo triclosán. A niveles inferiores a 0.015 ng/mL se observó una ligera disminución de la población de dos especies de algas, siendo más significativa cuando se alcanzaron concentraciones comprendidas entre 0.15 y 1.5 ng/mL. De igual modo, estudios *in vivo* sobre la reproducción sexual y asexual del alga *C. Ehrenbergii*, realizados por Ciniglia y colaboradores [Ciniglia C; 2005], pusieron de manifiesto que niveles inferiores a 0.125–5 mg/L no afectaron al tamaño de los cloroplastos y su morfología, aunque se inhibió el crecimiento vegetativo cuando los niveles alcanzaron los 0.5 mg/L, mermando incluso su reproducción sexual a niveles de 0.937 mg/L.

Dentro de los vertebrados, la toxicidad del TCS ha sido estudiada en peces y anfibios, principales pobladores de ríos y lagos. En un estudio inicial, el grupo de Orvos **[Orvos DL; 2002]** descubrió que las crías de la trucha arco-iris presentaban una disminución de su supervivencia cuando eran expuestas durante un periodo de 35 a 61 días a niveles de triclosán del orden de 71.3 ng/mL, sin que hubiese diferencia de longitud y peso con respecto a las muestras control. Sin embargo, se manifestaron malformaciones en la mandíbula, curvatura de la espina dorsal, inactividad y natación errática, factores que afectan negativamente a la supervivencia. Estimaron también la concentración media letal (EC₅₀) del triclosán para la carpa cabezona (*Pimeaples promelas*) y para la perca (*Leponis macrochirus*), siendo del orden de 260-440 ng/mL. Por último, observaron que el factor de bioconcentración del TCS aumentó prácticamente el doble cuando su concentración en agua disminuyó de 30 a 3 ng/mL.

Ishibashi y colaboradores **[Ishibashi H; 2004]** investigaron como afecta la presencia del triclosán al desarrollo reproductivo del medaka (*Oryzias Latipes*). Estimaron en 601 ng/mL el EC₅₀ (24 h) para las larvas, además de observar una reducción y retraso de la eclosión de 14 días. En esta misma línea, Tatarazako y colaboradores determinaron que el pez cebra (*Danio Rerio*) y el medaka (*Oryzias latipes*) presentaron una disminución del 50 % de sus poblaciones (IC₅₀) a concentraciones de triclosán del orden de 220 ng/mL y 400 ng/mL respectivamente, similares a los resultados obtenidos por Orvos **[Tatarazako N; 2004]**.

Con respecto a los anfibios, los grupos de Fraker y Veldhoen han evaluado la toxicidad del TCS para dos especies de rana diferentes. Para la rana leopardo (*Rana pipiens*), niveles de concentración de 230 ng/mL provocaron alteraciones del sistema nervioso, mientras que a concentraciones 1000 veces inferiores, se observó una disminución de peso importante, así como un aumento de mortandad en las crías **[Fraker SL; 2004]**. Para la rana toro (*Rana catesbeiana*), Veldhoen y colaboradores observaron cambios en la metamorfosis mediada por la hormona tiroidea en presencia de niveles de triclosán inferiores a 150 ng/mL durante 4 días, traduciéndose en una disminución de peso y un aumento del tamaño de la cola en los renacuajos **[Veldhoen N; 2006]**.

La actividad tiroidea también ha sido estudiada en ratas **[Crofton KM; 2007]** disminuyendo los niveles de hormonas tiroideas al aumentar la cantidad de triclosán inoculado, al igual que sucedía en la rana toro. En este caso, los niveles necesarios para observar efectos adversos fueron de 30 mg/kg por día.

Entre las aplicaciones del triclosán, la utilización como agente antimicrobiano en desodorantes o cremas, hace posible que se produzca la penetración cutánea del mismo. Estudios *in vivo* en ratas y humanos, pusieron de manifiesto que entre un 21 y un 28 % del triclosán era adsorbido dérmicamente por las ratas, mientras que para los humanos sólo el 15 % de la cantidad

aplicada penetraba en la piel. Dentro del organismo, el triclosán es transformado por el hígado en su conjugado glucurónico [Moss T; 2000], el cual tiene un tiempo de permanencia medio de 4 horas cuando es administrado oralmente a humanos [Sioufi A; 1997].

El mayor problema derivado del uso del triclosán, se debe a su reactividad, ya que se considera precursor de contaminantes prioritarios como los clorofenoles, dioxinas y compuestos policlorados generados en distintas reacciones de transformación que se enumerarán más adelante [Hell K; 2000][Graovac CM; 1995][Onodera S; 1987][Tixier C; 2002].

1.4. Distribución en el medio ambiente

En la bibliografía existente, se ha puesto de manifiesto la presencia de triclosán en distintas matrices medioambientales, tales como aguas residuales y superficiales, sedimentos, lodos, e incluso muestras de material biológico (músculo y grasa de pescado, leche materna, etc).

Sabaliunas y colaboradores [Sabaliunas D; 2003] afirmaron que es importante conocer los procesos que determinan la estabilidad del TCS, y por tanto, su cantidad disponible en el medio acuático, para la estimación de los posibles riesgos derivados de su presencia en el medio ambiente y, en caso necesario, establecer la correspondiente legislación encaminada a controlar el uso de este bactericida. En general, se observa que la distribución del TCS en el medio ambiente depende de varios factores entre los que cabe destacar:

- *El pH y la concentración de sólidos en suspensión.*- El triclosán es una sustancia ionizable, y la variación en estos parámetros modifica su distribución en el medio acuático, de modo que si el pH aumenta, la relación triclosán ionizado/triclosán sin ionizar también se incrementa. Una cantidad importante de materia particulada provoca un aumento del triclosán adsorbido en su superficie, siempre que el pH del agua sea inferior al pK_a del compuesto [Sabaliunas D; 2003][Tixier C; 2002].
- *Fotólisis.*- El triclosán es susceptible de sufrir una transformación fotolítica en las aguas superficiales, bajo la acción de la luz solar. La extensión de esta reacción es función del pH del medio (se produce un incremento de un factor de 30 del rendimiento de la reacción cuando el pH se incrementa de 5.9 a 11.0) y de la cantidad de luz solar que recibe. En cualquier caso, la fotodegradación del triclosán sólo es significativa en la superficie de las masas de agua. Por esta razón, los procesos de fotólisis son importantes en aguas superficiales pero no en aguas subterráneas o residuales [Ferrer I; 2004][Aranami K; 2007][Sánchez-Prado L; 2006 A y B].
- *Biodegradación.*- El triclosán puede ser biodegradado por los organismos presentes en el agua. Este proceso depende de la temperatura del medio y de la profundidad. Por ejemplo, la bacteria *Achromobacter xylosoxidans* degrada el triclosán en la superficie de las partículas en

suspensión generando como producto principal de degradación el 2,4-diclorofenol, del mismo modo que el alga *Scenedesmus Subspicatus* [Tixier C; 2002][Orvos DR; 2000].

- **Cloración.**- En presencia de cloro libre, el triclosán puede sufrir la halogenación de su anillo fenólico, dando lugar a los tetra y al penta clorano, y a dos productos de ruptura de su molécula, el 2,4-diclorofenol y el 2,4,6-triclorofenol [Rule KL; 2005][Canosa P; 2005 A].

Actualmente, existen múltiples estudios en los que se evalúa la concentración de triclosán en distintos tipos de matrices medioambientales. En el caso de muestras acuosas, las concentraciones varían enormemente entre aguas residuales y aguas superficiales, pero también en distintas zonas del planeta. Con estos datos, se pueden valorar los porcentajes de eliminación de triclosán por parte de las estaciones depuradoras de agua residual. Se estima que durante los tratamientos primarios se elimina entre un 7 y un 48 % del compuesto [Sabaliunas D; 2003][van Stee LLP; 1999], mientras que en el tratamiento secundario, la eliminación es del orden del 81-95.5 % [Lee HB; 2003][Bester K; 2003], tabla I.2. En cualquier caso, estos valores deben considerarse con suma precaución, puesto que hacen referencia única y exclusivamente a las concentraciones del compuesto en disolución, sin tener en cuenta la fracción adsorbida en el lodo.

Tabla I.2. Niveles de triclosán en agua residual tratada y sin tratar.

Localización	Agua residual sin tratar (ng/mL)	Agua residual tratada (ng/mL)	Referencia
España (Almería)	1.3-37.8	0.4-22.1	Agüera A; 2003
	2.3-562	0.1-269	Mezcua M; 2004
	0.39-4.2	0.08-0.40	Gómez MJ; 2007
----- España (Barcelona)	na	0.045	Kuster M; 2008
----- España (Coruña)	0.195-0.228	nd	Quintana JB; 2007
Suiza	0.6-1.3	0.11-0.65	Env Proy 861; 2003 ^a
	0.584-1.3	0.070-0.65	Lindstrom A; 2002
Suecia	0.1-1.5	<0.2	Env Proy 861; 2003 ^a
	0.38	0.16	Bendz D; 2005
	0.09-0.7	na	Paxéus N; 2004
	na	nd-0.50	Paxéus N; 1996
----- Alemania	nd	nd	Quintana JB; 2004
	1.1-1.3	0.043-0.059	Bester K; 2003
	0.01-0.6	na	Bester K; 2005

Localización	Agua residual sin tratar (ng/mL)	Agua residual tratada (ng/mL)	Referencia
Dinamarca	1.6-3.0	<1-1.8	Env Proy 861; 2003 ^a
Reino Unido	5.9-21.9	0.34-13.35	Sabaliunas D; 2003
	<3.1	nd	Kanda R; 2003
Noruega	0.043-2.8	0.16-0.48	Weigel S; 2004
Estados Unidos	1.6-6.1	0.020-0.035	Halden RU; 2005
	3.8-16.6	3.4-8.0	Mc Avoy D; 2002
	3-14	0.16-0.46	Shelver WL; 2007
	1.3	<0.002	Vanderford SA; 2006
	1	na	Stackelberg PE; 2004
	na	0.072	Thomas PM; 2004
	na	0.01-0.02	Boyd GH; 2003
México	0.66-2.04	na	Gibson R; 2007
Canadá	0.37-3.24	0.03-0.74	Lee HB; 2003
	0.87-1.83	na	Lee HB; 2005
	na	nd	Boyd GH; 2003
	na	0.063	Hua W; 2005
Japón	0.3-0.8	0.1	Nakada N; 2006
China	0.022-0.213	na	Wu JL; 2007
Australia	na	0.023-0.434	Ying GG; 2007

nd: por debajo de los límites de detección

na: no analizado

^ahttp://www.mst.dk/udgiv/Publications/2003/87-7972-984-3/HTML/kap04_eng.htm

Salvo alguna excepción, el nivel medio de triclosán en el agua residual sin tratamiento es del orden de 2 ng/mL, mientras que en el agua residual tratada, los niveles son inferiores a 0.1 ng/mL. En general, el porcentaje de eliminación del triclosán por parte de las estaciones depuradoras de agua residual oscila entre un 40 y un 100 %. Todo ello dependerá del tipo de tratamiento que reciba el agua residual, siendo el más efectivo el tratamiento con lodos activos [Heidler J; 2007][Thompson A; 2005].

Los niveles de TCS presentes en otras matrices acuosas se resumen a continuación, tabla I.3.

Tablas I.3. Niveles de triclosán en otras muestras de agua.

Tipo de muestra	Concentración (ng/mL)	Localización	Referencia	
Agua de grifo	0.032	Noruega	Bones J; 2006	
	<0.734	Estados Unidos	Lorraine GA; 2007	
	<0.001		Vanderford SA; 2006	
Agua grifo (previo tratamiento)	1.43	Estados Unidos	Lorraine GA; 2006	
Aguas pluviales	0.0016-0.029	Estados Unidos	Boyd GH; 2004	
Agua manantial	0.001-0.0012	México	Gibson R; 2007	
	nd	España (A Coruña)	Quintana JB; 2007	
	nd	Alemania	Quintana JB; 2004	
	0.003-0.010		Bester K; 2005	
	0.003-0.014	Suiza	Lindstrom A; 2002	
	0.081-0.130		Barber LB; 2006	
	0.14		Dinamarca	Eriksson E; 2003
	Río	0.087	Noruega	Bones J; 2006
		nd	Estados Unidos	Boyd GH; 2003
		0-0.14		Kolpin DW; 2004
		0.009-0.035		Zhang S; 2007
		0.01-0.12	Coogan MA; 2007	
		0.004-0.008	Canadá	Hua W; 2005
0.026-0.038		China	Wu JL; 2007	
0.035-1.023			Peng X; 2008	
<0.075			Australia	Ying GG; 2007
Lago		0.02	Suiza	Singer H; 2002
	<0.010	Estados Unidos	Vanderford SA; 2006	
	nd	Canadá	Boyd GH; 2003	
Mar	nd	Noruega	Weigel S; 2004	
	0.016-0.099	China	Wu JL; 2007	
	0.055-0.134	Japón	Nishi I; 2008	

nd: por debajo de los límites de detección

Aunque los valores de triclosán encontrados en aguas de río y lago son inferiores a los presentes en las aguas residuales, debido a su alta lipofilia, este compuesto es susceptible de

bioacumularse en animales y plantas presentes en ecosistemas que sufren continuas descargas de agua residual. Dentro de los organismos vivos, se ha estudiado la presencia del triclosán en peces de río. Alae y Valters [Alae M; 2003][Valters K; 2005] cuantificaron niveles de triclosán en plasma del orden de 0.61-10.4 ng/g, mientras que Adolffson-Erici [Adolffson-Erici M; 2002] y Houtman [Houtman CJ; 2004] analizaron bilis de pescado para determinar las concentraciones de triclosán presentes en este organismo. Los valores cuantificados oscilaron entre 10-710 ng/g (referido a peso total) y 14-80 µg/mL (referido a bilis), respectivamente. En algas, las concentraciones fluctuaron entre 10 y 146 ng/g [Coogan MA; 2007].

La distribución del triclosán también ha sido estudiada en matrices sólidas, principalmente en lodos procedentes de estaciones depuradoras de agua residual y sedimentos de ríos que reciben descargas de agua residual tratada. Debido a su alto carácter lipofílico, cabe esperar que los niveles sean mucho más elevados en estas muestras que en aguas residuales o superficiales, tabla I.4.

Tabla I.4. Niveles de triclosán encontrados en muestras de lodo y sedimento.

Tipo de muestra	Concentración (µg/g)	Localización	Referencia
Sedimento río	nd-0.036	España (A Coruña)	Morales S; 2005
Sedimento marino	0.1307-0.00027	España (Almería)	Agüera A; 2003
	0.012	España (Córdoba)	Morales-Muñoz S; 2005
	0.050	Estados Unidos	Burkhardt MK; 2005
	0.25-0.45	Alemania	Kronimus A; 2004
Sedimento lago	0.053	Suiza	Singer H; 2002
Lodo depuradora	0.4-5.4	España (A Coruña)	Morales S; 2005
	1-37	Grecia	Gatidou G; 2007
	0.028-6.4	Dinamarca	Env Proy 861; 2003 ^a
	1.2-1.3	Alemania	Bester K; 2003
	0.62-11.55	Canadá	Chu S; 2007
	0.09-16.79	Australia	Ying GG; 2007
	7.5-14.7	Estados Unidos	Mc Avoy D; 2002
Suelo	0.0006-0.009	Estados Unidos	Xu J; 2008

^ahttp://www.mst.dk/udgiv/Publications/2003/87-7972-984-3/HTML/kap04_eng.htm

Tal como se muestra en la tabla anterior, los niveles de triclosán en los lodos de depuradora son hasta 1000 veces superiores a los detectados en las aguas residuales sin tratar. En ocasiones,

estos lodos son utilizados como abonos. Por ello, es necesario controlar de algún modo la distribución del triclosán en esta matriz sólida **[Heidler JL; 2007]**.

Por último, cabe destacar estudios en los que se evaluó la presencia de triclosán en leche materna, en plasma humano y orina procedente de individuos que usaban productos de cuidado personal que contienen en su formulación este bactericida. Los niveles detectados en leche materna estuvieron comprendidos entre 0.022 y 9 ng/g **[Allmyr M; 2006 A y B][Adolfsson-Erici M; 2002][Dayan AD; 2007]**. En plasma, los niveles oscilaron entre 0.4 y 38 ng/g **[Allmyr M; 2006 B]** y en orina fueron del orden de 127 ng/mL **[Ye X; 2005]**.

Los posibles productos de transformación del triclosán también han sido analizados en las matrices anteriormente indicadas. Quizá el más importante de todos ellos, y directamente relacionado con él, es el metiltriclosán, generado principalmente en las plantas depuradoras como producto de biometilación. En los lodos, sus concentraciones están comprendidas entre 0.05-0.45 µg/g **[Mc Avoy D; 2002]**, mientras que en influentes y efluentes los valores oscilan entre 0.001-0.04 y 0.002-0.011 ng/mL **[Irgasan; 1998]**. Son las matrices biológicas aquellas en las que se ha analizado exhaustivamente la presencia del metiltriclosán, principalmente en peces de río. Balmer y colaboradores cuantificaron niveles de metiltriclosán del orden de 1-300 ng/g, referido a tejido graso, en truchas procedentes de un lago sueco en donde los niveles de metiltriclosán en agua eran de 0.02-1.2 ng/L **[Balmer ME; 2004]**. Niveles similares de metiltriclosán fueron encontrados uno y dos años después del primer muestreo en ese mismo lago (nd-233 ng/g y 130-2100 ng/g en lípidos, respectivamente) **[Valters K; 2005][Buser HR; 2006]**. En el plasma de pescado los niveles de metiltriclosán cuantificados son 1000 veces inferiores a los encontrados en grasa debido a la elevada lipofilia de este compuesto (log K_{ow} 5.1) **[Alaee M; 2003]**.

Los clorofenoles relacionados con el triclosán: el 2,4-diclorofenol, 2,3,4-triclorofenol **[Onodera S; 1998]** y el 2,4,6-triclorofenol **[Canosa P; 2005 A y B][Rule KL; 2005]** también fueron cuantificados en algunos estudios. Para el 2,4-diclorofenol, se han detectado concentraciones en el influente de una depuradora del orden de 0.03-0.20 ng/mL, mientras que para el efluente correspondiente, los niveles oscilaron entre 0.01 y 0.21 ng/mL, con lo que se concluyó que prácticamente no hay eliminación de este compuesto **[Lee HB; 2003]**. Para el caso de los dos triclorofenoles supuestamente relacionados, es el 2,4,6-triclorofenol el que presenta mayores niveles de concentración en el influente (0.02-0.1 ng/mL) frente al 2,3,4-triclorofenol **[Eriksson E; 2003]**. Concentraciones similares de 2,4,6-triclorofenol fueron detectadas por Quintana y colaboradores **[Quintana JB; 2007]** en agua residual no tratada.

Los clorofenoles relacionados con el triclosán no sólo fueron analizados en muestras de agua residual, sino que también fueron detectados en orina. El grupo de Ye [Ye X; 2005] encontró 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol a niveles de 1.9 y 0.5 ng/mL, respectivamente, en esta matriz.

Otros compuestos relacionados con el triclosán son los closanos clorados. Estos son derivados halogenados del triclosán los cuales se forman en presencia de cloro en el medio acuoso. Mc Avoy y colaboradores detectaron estos compuestos en agua residual sin tratar y agua residual tratada a niveles inferiores a 0.6 ng/mL, mientras que en el lodo la concentración media de estos fenoxifenoles tetra- y pentaclorados fue de 0.42 µg/g [Mc Avoy D; 2002].

Por último, las dioxinas relacionadas con el triclosán se han detectado en aguas residuales sin tratar y tratadas a niveles de 0.02-8.9 ng/mL y 0.004-0.4 ng/mL, respectivamente [Mezcua M; 2004].

1.5. Productos de transformación del triclosán

El triclosán, como producto de cuidado personal, presenta una baja toxicidad aguda y un porcentaje apreciable de eliminación o degradación medioambiental. Como resultado de procesos naturales o industriales (por ejemplo, el tratamiento de aguas residuales) parte del triclosán sufre procesos de mineralización completa [Federle TW; 2002][Heidler J; 2007]. Sin embargo, una fracción apreciable del mismo es introducido en el medio ambiente donde puede transformarse en otros compuestos clorados, como por ejemplo, el metiltriclosán, las dioxinas, clorofenoles y otros closanos clorados, los cuales poseen una elevada toxicidad y/o un importante carácter bioacumulativo.

1.5.1. Closanos policlorados y clorofenoles

En relación a la formación de derivados clorados del triclosán, la primera referencia existente se remonta a 1987. Onodera y colaboradores [Onodera S; 1987] observaron la formación de 2,4-diclorofenol, 2,3,4-triclorofenol, 4,5-dicloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol [tetraclorano II], 5,6-dicloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol [tetraclorano I] y 4,5,6-tricloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol [pentaclorano] cuando trataban agua residual conteniendo triclosán con hipoclorito sódico. Kanetoshi y colaboradores [Kanetoshi A; 1987] también identificaron los tres closanos anteriores como resultado de la inmersión de tejidos tratados con triclosán en una disolución de hipoclorito sódico.

Años más tarde, el grupo de Rule [Rule KL; 2005] estudió la cinética de reacción del triclosán en agua clorada. Al igual que Onodera y Kanetoshi, observaron la aparición de los closanos anteriores y el 2,4-diclorofenol, aunque el triclorofenol que identificaron fue el 2,4,6-triclorofenol.

Estos resultados fueron obtenidos paralelamente al trabajo llevado a cabo en esta Tesis Doctoral [Canosa P; 2005 A]. Trabajos posteriores del grupo de Rule demostraron la evolución de los compuestos anteriores a cloroformo [Fiss EM; 2007].

La formación de 2,4-diclorofenol no solamente es debida a reacciones de halogenación y posterior ruptura del enlace éter, sino que cierto tipo de algas y bacterias, son capaces de transformar el triclosán en 2,4-diclorofenol [Orvos DR; 2000]. Además, se forma en procesos de cloración de fenoles, procedentes de ácidos húmicos y fúlvicos, en agua desinfectada con cloro libre. El 2,4,6-triclorofenol se genera por sucesivas sustituciones del diclorofenol [Patnaik P; 2000].

Con respecto a la toxicidad de estas sustancias, el 2,4-diclorofenol es conocido por ser un potencial disruptor endocrino [Graovac M; 1995][Mol HGJ; 2002]. Los fenoles, y en general, los fenoles clorados, son tóxicos a concentraciones de partes por billón (ng/mL). La Agencia de Protección Medioambiental (EPA) recomienda que el agua potable no contenga más de 0.03 µg/mL de fenoles clorados para exposiciones de 1 a 10 días en el caso de un adulto sano [http://www.atsdr.cdc.gov/e/toxfaqs/estfacts107.html]. Además, el 2,4-diclorofenol está incluido en la lista de candidatos de contaminantes prioritarios de la EPA [http://www.epa.gov/iris].

El 2,3,4-triclorofenol y el 2,4,6-triclorofenol son considerados predioxinas, ya que experimentos de descomposición térmica sobre cenizas muestran la formación de dioxinas a partir de estos compuestos [Hell K; 2000][Capdeville J; 2002]. Asimismo, el 2,4,6-triclorofenol está clasificado como posible carcinogénico [http://www.epa.gov/iris][Fiss EM; 2007], siendo los niveles máximos permitidos de 0.012 µg/mL. Por último, con respecto a los closanos policlorados, Kanetoshi evaluó una dosis letal media, LD₅₀, para ratones de entre 430 y 710 mg/kg [Kanetoshi A; 1992].

1.5.2. Dioxinas

El triclosán es conocido como una predioxina. Las dioxinas son sustancias altamente tóxicas y consideradas por la EPA como contaminantes prioritarios, de modo que sus niveles en el medio ambiente están estrictamente controlados. La formación de dioxinas a partir del triclosán, se puede producir mediante dos vías:

➤ Vía fotoquímica.- La formación de dioxinas relacionadas con el triclosán, principalmente la 2,8-diclorodibenzodioxina, puede llevarse a cabo mediante fotólisis directa o indirecta.

-Fotólisis directa.- La formación de dioxinas mediante fotólisis directa es más rápida a pH superior al pK_a del triclosán [Sánchez-Prado L; 2006 A]. El grupo de Arnold [Arnold WA; 2003] estudió la fotodegradación del TCS a distintos pHs y longitudes de onda. La longitud de onda máxima de absorción en el espectro del triclosán corresponde a 279 nm, mientras que para la especie desprotonada es de 292 nm, coincidiendo en la zona del ultravioleta cercano. De este modo,

evaluaron la vida media del triclosán en agua en función de la época del año (cantidad de luz) y de la forma química existente, tabla I.5.

Tabla I.5. Tiempo de vida media del triclosán en función de la forma existente y de la época del año.

Tiempo de vida media	Forma protonada	Forma desprotonada
Verano	2.55 horas	6.15 minutos
Invierno	5.5 días	5.35 horas

También es importante la presencia de materia orgánica disuelta en el medio acuoso, ya que el rendimiento de la reacción disminuye en un 20 %, debido a la adsorción del triclosán sobre la superficie de las partículas en suspensión [Tixier C; 2002].

-Fotólisis indirecta.- La formación de dioxinas también está descrita mediante la fotólisis indirecta, debido a la reacción del triclosán con los radicales hidroxilo o con el oxígeno singlete generados por la acción de la radiación solar. Tixier y colaboradores [Tixier C; 2002] estudiaron este fenómeno y concluyeron que era muy favorable, debido a las altas constantes de velocidad de reacción y a la concentración relativamente elevada de radicales en agua.

Mezcua [Mezcua M; 2004] y Ferrer [Ferrer I; 2004] estudiaron detalladamente los productos que se generan en la fotólisis del triclosán. Mezcua y colaboradores observaron la formación, como producto mayoritario, de la 2,7/2,8-dibenzodihidrocloro-*p*-dioxina y evaluaron su presencia en aguas residuales. Concluyeron que la concentración máxima de dioxina se alcanzaba a los 1000 minutos de exposición solar. Ferrer y colaboradores investigaron la presencia de productos intermedios generados en la degradación fotoquímica del triclosán, utilizando como técnica de detección la cromatografía de líquidos acoplada a un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo. Estos productos intermedios presentaron pérdidas de cloro, ruptura del enlace éter formando un monoclorodihidroclorado, y sustitución de un átomo de cloro por un grupo hidroxilo.

La velocidad de la reacción de fotodegradación depende de si ésta se produce en agua dulce o en agua salada. Aranami y colaboradores [Aranami K; 2007] observaron que el tiempo de vida media del triclosán en agua dulce es de 4 días, frente a los 8 días para el agua salada.

➤ *Combustión de lodos conteniendo triclosán.-* El hecho de que se formen dioxinas mediante la combustión de lodos es de gran relevancia, ya que se conoce que un 15-20 % del triclosán eliminado en las plantas de tratamiento de agua residual, se adhiere a los lodos. En algunas estaciones depuradoras, estos lodos son eliminados mediante incineración.

Kanetoshi y colaboradores [Kanetoshi A; 1987] estudiaron la pirolización del triclosán y closanos clorados relacionados. Observaron la formación de diversas dioxinas tricloradas, tetracloradas, pentacloradas e incluso hexacloradas. En la siguiente tabla, se muestra el porcentaje de dioxina generada respecto a la cantidad total de closanos, tabla I.6.

Tabla I.6. Porcentaje de dioxinas formado a partir de la combustión de lodos conteniendo triclosán y closanos relacionados.

% Dioxina formada en la combustión de los lodos					
	Di-CDD	Tri-CDD	Tetra-CDD	Penta-CDD	Hexa-CDD
<i>TCS</i>	42	--	--	--	--
<i>Tetra I</i>	--	44	25	1	--
<i>Tetra II</i>	--	22	46	--	--
<i>Penta</i>	--	--	16	--	--

1.5.3. Metiltriclosán

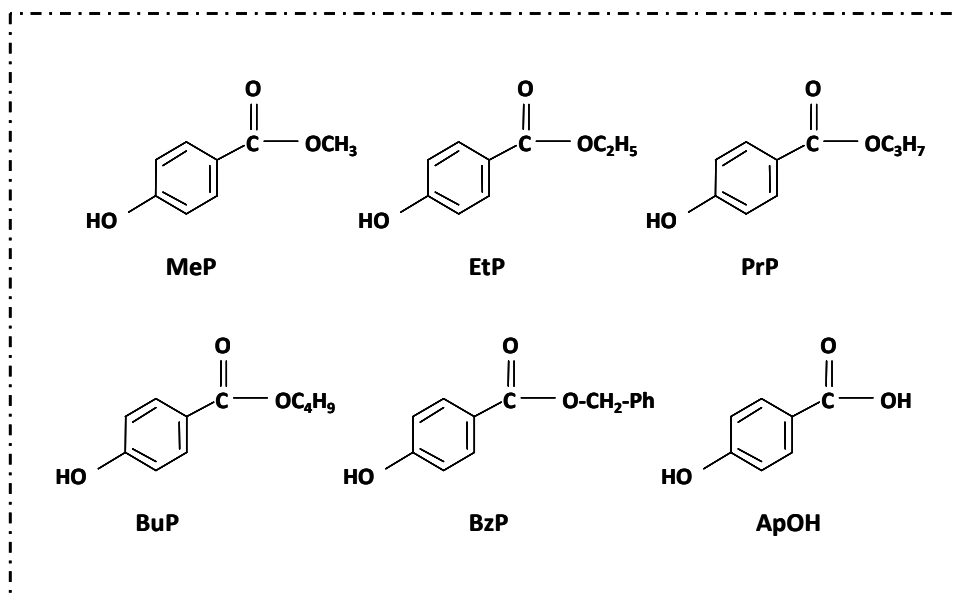
El triclosán puede ser biotransformado por diversos organismos en su anisol, el metiltriclosán. Este compuesto es mucho más estable frente a la degradación fotoquímica, bioacumulándose en los tejidos (principalmente en los lipídicos) de aquellos seres vivos expuestos a descargas continuas de aguas conteniendo triclosán. Por lo tanto, puede ser considerado como un marcador de los niveles de triclosán en aquellos medios que sufren descargas de aguas residuales [Balmer ME; 2004][Lindstrom A; 2002]. Además, los niveles de metiltriclosán detectados son superiores en los efluentes de las plantas depuradoras frente a los influentes, lo que indica que se genera principalmente en las depuradoras de agua residual [Coogan MA; 2007].

II. PARABENES

2.1. Definición, estructura y propiedades de los parabenes

Los parabenes son ésteres del ácido 4-hidroxibenzoico ampliamente utilizados como estabilizantes y preservativos en cosméticos, jabones, alimentos, etc. Los más empleados son el metilparaben o *parahidroxibenzoato* de metilo (E-218), el etilparaben o *parahidroxibenzoato* de etilo (E-214), el propilparaben o *parahidroxibenzoato* de propilo (E-216), butilparaben o *parahidroxibenzoato* de butilo y el bencilparaben o *parahidroxibenzoato* de bencilo en niveles inferiores al 0.8 % (p/p), expresados como ácido *parahidroxibenzoico*. Las estructuras de los parabenes junto con la del ácido del que proceden se muestran en la figura II.1.

Figura II.1. Estructura del metilparaben (MeP), etilparaben (EtP), propilparaben (PrP), butilparaben (BuP), bencilparaben (BzP) y del ácido *p*-hidroxibenzoico (ApOH).



Los parabenes son sólidos relativamente solubles en agua e hidrolíticamente estables que presentan mayor carácter hidrofóbico al aumentar el tamaño de su cadena hidrocarbonada. En la tabla II.1, se muestran las propiedades físico-químicas más relevantes de los mismos.

Tabla II.1. Propiedades físico-químicas de los parabenos y el ácido *p*-hidroxibenzoico.

Propiedades	MeP	EtP	PrP	BuP	BzP	ApOH
<i>P</i> _m (g/mol)	152.15	166.17	180.20	194.23	228.24	138.12
<i>pK</i> _a	8.30	8.30	8.20	8.22	8.20	4.57
Log <i>K</i> _{ow}	1.86	2.40	2.90	3.46	3.60	1.40
Punto ebullición (°C)	265	297	294	309	390	336
Punto fusión (°C)	116	120	125	129	168	171
<i>P</i> vapor (Torr)	5.55 10 ⁻³	7.59 10 ⁻⁴	9.30 10 ⁻⁴	3.56 10 ⁻⁴	1.24 10 ⁻⁶	4.48 10 ⁻⁵
Solubilidad, pH 3 (g/L)	64	25	12	5	1.2	8.3
Solubilidad, pH 7 (g/L)	67	25	12	5	1.2	1000
Solubilidad, pH 9 (g/L)	377	140	81	35	8.9	1000

2.2. Aplicaciones

Los ésteres del ácido *p*-hidroxibenzoico (parabenos) son ampliamente utilizados como preservativos en productos de cuidado personal y en alimentos. Son activos frente hongos y levaduras y contra algunos microorganismos Gram + y Gram -, provocando disrupción en los procesos de transporte de membrana, inhibición de la síntesis de ADN y ARN o uniéndose a enzimas (ATPasas y fosfotransferasas) clave para el desarrollo de las bacterias [Valkova N; 2001].

Los parabenos no están incluidos en el Anexo I de la lista de sustancias peligrosas de la Directiva 67/548/CE; sin embargo, la directiva 76/768/CE de la Unión Europea restringe sus niveles en cosméticos a una concentración máxima de 0.4 % para cada uno, ó 0.8 % (expresado como ácido) para mezclas de los mismos [Borremans M; 2004]. Debido a su sinergia de actuación y a que su toxicidad relativa aumenta con el tamaño de la cadena, es importante tenerlos en cuenta a la hora de preparar mezclas de los mismos para minimizar los riesgos al consumidor [Charnock C; 2007][Doron S; 2001].

Como aditivos en cosméticos, el metilparaben y el propilparaben son los más utilizados en un rango de concentraciones normalmente inferior a 0.3 % y 0.1 % respectivamente, aunque pueden llegar a encontrarse niveles próximos al 1 %. Debido a su gran estabilidad térmica a diferentes pHs, y a su escasa adsorción sobre la superficie de los envoltorios, son ampliamente utilizados en cosmética e incluso son usados como antimicrobianos en alimentos. De hecho, se añaden en bebidas alcohólicas, productos congelados, gelatinas, pulpa de tomate, zumo de frutas, siropes, etc, en donde sus niveles oscilan entre 450-2000 µg/g, lo que supone una ingesta de 4-6 mg/Kg/día para un adulto [Darbre PD; 2004]. También se incorporan en fármacos, supositorios, anestésicos, colirios,

píldoras, jarabes e inyectables en concentraciones inferiores al 1 % [Soni MG; 2002][Peck AM; 2006].

En la naturaleza también pueden encontrarse en algunas frutas, vino blanco, e incluso se ha descubierto que el metilparaben actúa como una feromona en los perros [Soni MG; 2002].

2.3. Toxicidad

El comité científico de alimentación de la Unión Europea estableció una ingesta diaria aceptable (Acceptable Daily Intake) para los parabenes del orden de 10 mg/kg, expresado como la suma de MeP, EtP y PrP y de sus sales sódicas [Harvey PW; 2004 A y B].

No existe una legislación respecto a las dosis considerada como tóxica, pero la Directiva Europea de Cosméticos 76/768/CEE, en su Anexo VI, indica que los niveles máximos en cosméticos no deben superar el 0.4 % como compuestos individuales y el 0.8 % para mezclas de los mismos. Muchos estudios indican que no son mutagénicos, pero que pueden causar aberraciones cromosómicas, particularmente en presencia de bifenilos policlorados. A nivel celular pueden provocar disrupción de la función celular a través de la inhibición de los lisosomas [Darbre PD; 2004].

Los parabenes se encuentran en una gran variedad de productos en bajas concentraciones. Su importancia viene dada por la exposición continua a la que está sometida la población [Byford JR; 2002]. Son adsorbidos inmediatamente por el tracto gastrointestinal y por la sangre, hidrolizados al ácido *p*-hidroxibenzoico o su conjugado, y excretados por la orina. También son adsorbidos por la piel y gracias a las carboxilesterasas, se convierten en el ácido *p*-hidroxibenzoico [Pugazhendhi D; 2005].

En contacto con la piel, son acumulados en los componentes grasos de los tejidos humanos debido a sus moderados coeficientes de partición octanol/agua ($\log K_{ow}$ 1.8 a 3.6). Además, algunos estudios recientes mostraron la presencia de parabenes en los cánceres de mama (niveles inferiores de 20 ng/g), de modo que se especula con que puedan influir en el crecimiento y desarrollo de los tumores [Darbre PD; 2004 y 2006][Harvey PW; 2004 A y B][Zhang Q; 2005]. Estudios *in vitro*, utilizando las células cancerosas MCF-7, muestran que tienen la capacidad de desplazar al 17- β -estradiol del receptor estrogénico citosólico, responsable de la proliferación y crecimiento de tumores mamarios [Golden R; 2005]. En estudios *in vivo* con roedores, se observó un incremento en la pared vaginal y en el peso del útero en hembras, y disminución de la calidad del esperma en machos, cuando se les aplicó tópicamente un preparado conteniendo en su formulación los parabenes. Su subproducto más importante, el ácido *p*-hidroxibenzoico, aplicado tópicamente provocó estos efectos a niveles de 5 μ g/g, 500 veces superior a la dosis de 17- β -estradiol necesaria para provocar la misma respuesta [Golden R; 2005].

Dentro de los parabenos, el más potente como disruptor endocrino es el butilparaben, aún así, su carácter estrogénico es 10 000 veces inferior que el 17- β -estradiol, por lo que los niveles a los que estamos expuestos no deberían afectar al ser humano [Byford JR; 2002][Harvey PW; 2004 y 2006].

Los efectos del butilparaben sobre hormonas tiroideas y reproductoras en el hombre fueron estudiados por Janjua y colaboradores [Janjua NRQ; 2007]. La administración cutánea del butilparaben, en preparados conteniendo un 2 % de este compuesto, durante dos semanas consecutivas a niveles de 2-3 mg/cm², dió lugar a una concentración de 135 ng/mL en suero. La cantidad encontrada parece no modificar los niveles de hormonas tiroideas y sexuales.

El mayor problema que pueden desencadenar estos compuestos son los productos de reacción que se puedan generar en los distintos medios. Así, en aguas potables, en presencia de cloro a niveles bajos (μ g/mL), los parabenos son susceptibles de transformarse en compuestos mono- y dihalogenados, cuyas posibles repercusiones en el medio ambiente y en el ser humano son desconocidas [Alum A; 2004][Canosa P; 2006 A].

2.4. Distribución en el medio ambiente

Los parabenos, al igual que el triclosán, son introducidos en el medio acuático por la continua descarga de agua residual, así como el vertido directo de detergentes, jabones o productos que puedan contener en su formulación estos compuestos.

Los parabenos, en general, son estables en medio acuoso a diferentes pHs y a elevadas temperaturas. Por otra parte, su moderado coeficiente de partición octanol-agua indica la posibilidad de ser adsorbidos en matrices sólidas, principalmente en medios ácidos, ya que a pH básico su solubilidad se ve incrementada unas 50 veces.

Son fotoquímicamente estables, de modo que en presencia de luz no se descomponen, pero, en cambio, son biodegradables por organismos dando lugar al ácido *parahidroxibenzoico*, considerado un potencial disruptor endocrino. Estudios de cloración en agua realizadas en la presente Tesis Doctoral, mostraron la posibilidad de transformarse en compuestos clorados en tiempos relativamente cortos al igual que el triclosán [Canosa P; 2006 A].

Algunos trabajos han evaluado su presencia en el medio acuático. En aguas de río, se han detectado niveles inferiores a los 80 ng/L para el propil, etil y metilparaben [Benijts T; 2004][Canosa P; 2006 B]. En aguas residuales, también se ha analizado la presencia de los parabenos, siendo el propilparaben la especie mayoritaria [Lee HB; 2005]. En general, las concentraciones detectadas de estos compuestos son inferiores a 2.5 ng/mL para agua residual sin tratar, mientras que el efluente de la planta depuradora presenta niveles inferiores a 100 ng/L. En la tabla II.2 se resumen los niveles descritos en la bibliografía en matrices acuosas.

Tabla II.2. Concentración de parabenes en aguas residuales y superficiales.

Tipo de muestra	MeP (ng/mL)	EtP (ng/mL)	PrP (ng/mL)	BuP (ng/mL)	BzP (ng/mL)	Localización	Referencia
<i>Influyente</i>	0.10-1.47	0.02-0.27	0.20-2.43	0.02-0.26	nd	Canadá	Benijts T; 2004
<i>Influyente</i>	2.6	0.6	na	na	na	Dinamarca	Eriksson E; 2003
<i>Efluente</i>	0.02-0.03	<0.01	<0.01-0.04	<0.01	nd	Canadá	Benijts T; 2004
<i>Efluente</i>	nd-0.30	<0.1-0.2	<0.1-0.3	na	nd	Suecia	Paxéus N; 1996
<i>Efluente</i>	0.002	nd	0.003	na	na	Bélgica	Benijts T; 2004
<i>Efl.industrial</i>	0.004	nd	0.006	na	na	Bélgica	Benijts T; 2004
<i>Río</i>	0.025	nd	0.078	na	na	Bélgica	Benijts T; 2004

nd: por debajo de los límites de detección

na: no analizado

Su presencia en lodos, procedentes de las plantas depuradoras de agua residual todavía no ha sido estudiada, en cambio, su distribución en atmósferas interiores fue evaluada por Rudel y colaboradores [Rudel RA; 2003]. Estos autores investigaron los niveles de MeP, EtP y BuP en aire y polvo de 120 hogares estadounidenses, encontrando los niveles de concentración que se muestran en la tabla II.3.

Tabla II.3. Distribución de parabenes en atmósferas interiores [Rudel RA; 2003].

	MeP	EtP	BuP
<i>Aire (ng/m³)</i>	nd-21	nd-4	3.2
<i>Polvo (µg/g)</i>	nd-8.24	nd-2.18	nd-0.223

nd: por debajo de los límites de detección

En relación a las matrices biológicas, la detección de parabenes en tumores mamarios ha destapado la alarma sobre la posible relación existente entre el uso de cosméticos conteniendo parabenes en su formulación y el posible desarrollo de cáncer de mama. El grupo de Darbre, dedicado al estudio toxicológico de los parabenes, analizó tumores de 20 individuos con cáncer de mama. Todas las muestras fueron positivas, siendo los niveles máximos detectados de 12.8 ng/g para MeP, 2 ng/g para EtP, 2.6 ng/g para PrP y 2.3 ng/g para BuP [Darbre PD; 2004]. Los parabenes también han sido detectados en fluidos biológicos como leche materna [Ye X; 2008 A] y en suero humano [Ye X; 2008 B] a niveles del orden de los bajos ng/mL.

2.5. Productos de transformación de los parabenos

2.5.1. Ácido *p*-hidroxibenzoico

El ácido *p*-hidroxibenzoico es un producto de degradación de los parabenos. Estudios con animales muestran que los parabenos son adsorbidos inmediatamente por el tracto intestinal y por la sangre, hidrolizados al ácido correspondiente dando lugar a su conjugado glucurónico, siendo éste excretado por la orina. Los parabenos también pueden ser adsorbidos rápidamente por la piel en donde las carboxilesterasas son capaces de hidrolizarlos al ácido, que penetrará por vía dérmica en el organismo. El ácido *p*-hidroxibenzoico se caracteriza por tener propiedades estrogénicas similares al estradiol, tanto en ensayos *in vivo* como *in vitro* [Pugazhendhi D; 2005][Darbre PD; 2006][Golden R; 2005].

2.5.2. Productos de halogenación

Cuando los productos de cuidado personal entran en contacto con agua de grifo clorada, el cloro presente en el agua puede reaccionar con los parabenos presentes en su formulación.

En su estructura, los parabenos presentan un éster y en posición *para* al mismo, un grupo hidroxilo. El grupo hidroxilo es un grupo dador, de modo que los pares electrónicos no compartidos se deslocalizan en el anillo aumentando su densidad electrónica, sobre todo en las posiciones *orto* y *para* al mismo. Por otra parte, el grupo éster es lo que se denomina un grupo desactivante en *orto* y *para*, dirigiendo la sustitución electrófila aromática hacia la posición *meta*. Estas dos contribuciones favorecen la introducción de electrófilos en las dos posiciones en *orto* al grupo hidroxilo. Los productos derivados de esta reacción en aguas cloradas son el 3-cloro-4-hidroxibenzoato de alquilo y 3,5-dicloro-4-hidroxibenzoato de alquilo. Del mismo modo, la presencia de bromuro en las aguas naturales, principalmente de ciudades costeras, en niveles del orden de 2-660 ng/mL, hace posible que reaccione con el anillo aromático mediante una sustitución electrófila aromática cuando es oxidado a bromo en presencia de cloro [Richarson SD; 2003][von Gunten U; 2003]. Por lo tanto, es posible también la formación de hidroxibenzoatos de alquilo bromados. En general, estos compuestos son más lipofílicos que los parabenos (log K_{ow} 2.48-6.78), de modo que tendrían mayor tendencia a bioacumularse en los tejidos, y por lo tanto a ser potencialmente más tóxicos, principalmente los bromados [Hansch C; 1972], aunque, a día de hoy, no hay ningún estudio que demuestre estos datos. Por otra parte, su solubilidad es mayor a pHs en torno a 7, debido a que sus pKas oscilan entre 3.1 y 6.78, con lo que cabe esperar que se encuentren mayoritariamente en disolución acuosa.

III. METODOLOGÍA ANALÍTICA

El fin de cualquier metodología de preparación de muestra es disponer del analito en el estado más “puro” posible y en un disolvente compatible con la técnica de determinación utilizada. Para ello, en la mayoría de los problemas analíticos es necesario realizar una primera etapa en la cual aislaremos los analitos de la matriz que los contiene consiguiendo su purificación y concentración. En muchos casos, es inevitable una etapa de transformación de los analitos, variando una serie de propiedades de los mismos para facilitar su determinación.

En este trabajo se han considerado distintos tipos de muestras, sólidas y líquidas, utilizando diversas técnicas de preparación de muestra que describiremos a continuación en función del tipo de matriz a la cual se aplican.

3.1. Preparación de muestra para matrices acuosas

Las matrices acuosas suelen contener los compuestos a concentraciones muy inferiores a los límites de detección de los equipos utilizados en la etapa de determinación. Además, es muy probable que la matriz no sea compatible con la técnica de medida, por lo cual suele ser necesaria una etapa de preparación de muestra que, sobre todo en matrices medioambientales, nos permita concentrar los analitos y a su vez separarlos de otros compuestos que puedan interferir en su determinación.

Entre los métodos preparación de muestra empleados en esta Tesis Doctoral figuran la extracción líquido-líquido (LLE), la extracción en fase sólida (SPE) y la microextracción en fase sólida (SPME).

3.1.1. Extracción líquido-líquido (LLE)

La extracción líquido-líquido es una técnica de preparación de muestra en la cual se produce una transferencia de los analitos desde una fase, generalmente acuosa, a otra orgánica, transferencia regida por una constante de reparto. El mayor problema derivado de esta técnica es el gran consumo de disolventes, con el correspondiente gasto y problema medioambiental.

La LLE ha sido utilizada para extraer triclosán [Graovac M; 1995][Bester K; 2003 y 2005] [Sabaliunas D; 2003], metiltriclosán [Shelver WL; 2007], clorofenoles [Hanada Y; 2002][Mol HGJ; 2002] e incluso los compuestos policlorados procedentes de la halogenación del triclosán [Okumura T; 1996] en muestras de agua residual y agua superficial. En estos trabajos, el pH de la muestra se ha ajustado a 2, y la extracción ha sido llevada a cabo con hexano, tolueno o diclorometano. El extracto obtenido es concentrado a un volumen conocido y derivatizado con diazometano [Kanda R; 2003],

anhídrido acético [Adolfsson-Erici M; 2002], o agentes sililantes [Sabaliunas D; 2003][Shelver WL; 2007] para su posterior análisis por cromatografía de gases. Además de para matrices acuosas, la LLE se ha utilizado como técnica de extracción del triclosán de alimentos, potencialmente contaminados por una posible migración del bactericida desde el film protector, en zumos, fiambres, etc [Sanches-Silva A; 2005], y para determinar la cantidad de triclosán en los plásticos que lo contienen como aditivo [Junker LM; 2004].

La extracción con disolventes orgánicos también se ha empleado en la determinación de triclosán y metiltriclosán en matrices biológicas, tales como orina [Sioufi A; 1997], plasma humano [Birkel M; 1993][Sioufi A; 1997] y de pescado [Allmyr M; 2006 A y B][Alaee M; 2003], bilis [Houtman CJ; 2004], leche materna [Adolfsson-Erici M; 2002][Allmyr M; 2006 A y B] y placa dental [Rasmussen HI; 1996]. También se utilizó para extraer los parabenos en tejido tumoral de pacientes con cáncer de mama [Darbre PD; 2004]. En todas las aplicaciones descritas es necesaria una purificación posterior del extracto debido a la gran complejidad del mismo.

3.1.2. Extracción en fase sólida (SPE)

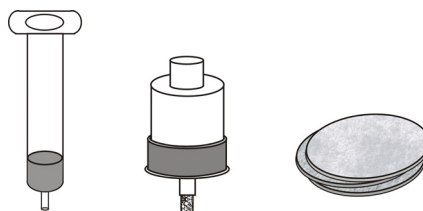
La SPE se desarrolló a mediados de los años 70 como alternativa a la LLE. Hoy en día es una de las técnicas de preparación de muestra más ampliamente utilizadas en el caso de matrices líquidas o incluso gaseosas. Mediante la SPE, conseguimos concentrar y/o purificar los analitos mediante su retención en una fase sólida, o una fase líquida inmovilizada sobre un soporte sólido, para a continuación proceder a su elución con un disolvente adecuado [Rodríguez I; 2000][Thurmann EM; 1998]. Entre las múltiples ventajas que presenta destacan las siguientes:

- baja manipulación de la muestra
- alto poder de concentración
- obtención de extractos purificados con altas recuperaciones
- menor consumo de disolventes en comparación con LLE
- ausencia de emulsiones
- posibilidad de automatización
- versatilidad en el tipo de adsorbentes utilizados [Cámara C; 2002][Cela R; 2002].

El adsorbente de extracción en SPE está contenido en tres posibles formatos: discos, cartuchos y jeringas. El primero se utiliza principalmente para concentrar grandes volúmenes de muestra, entre 2 y 4 L [Loraine GA; 2006][Boyd GH; 2003 y 2004], permitiendo flujos de paso de

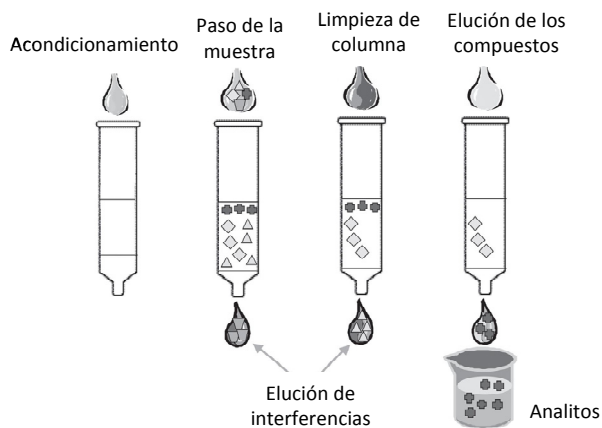
líquido muy elevados debido a la escasa resistencia al paso de muestra que poseen, mientras que los cartuchos y jeringas pueden ser fácilmente integrados en sistemas *on-line* con el equipo de medida, generalmente un cromatógrafo de líquidos. De este modo, la manipulación de la muestra es mínima, aunque los volúmenes concentrados son inferiores a los empleados en las aplicaciones *off-line* [Bones J; 2006][Ye X; 2005 y 2006].

Figura III.1. Distintos formatos de SPE: Jeringa, Cartucho y Discos.



El proceso de concentración de la muestra en SPE consta de las siguientes etapas básicas, descritas en la figura III.2.

Figura III.2. Esquema de preparación de muestra mediante SPE.



1. *Acondicionamiento de la fase estacionaria.*- Se hace pasar a través del cartucho un disolvente o mezcla de disolventes adecuados, eliminando así las impurezas, hidratando la fase estacionaria y facilitando la transferencia de materia con la muestra.

2. *Paso de la muestra a través del material adsorbente.*- El objetivo de esta etapa es retener cuantitativamente el analito, consiguiendo además un cierto grado de selectividad.

3. *Lavado.*- Se utilizan disolventes con gran afinidad por las interferencias.

4. *Elución.*- Con un disolvente apropiado se recupera el analito de la fase adsorbente. Por lo general se utiliza un pequeño volumen de disolvente orgánico, aunque también se puede realizar una desorción térmica [Cela R; 2002].

Las fases adsorbentes en SPE son similares a las empleadas en cromatografía de líquidos. Las más comunes son las de sílices enlazadas, polímeros de tipo estireno-divinilbenceno, carbón grafitizado, silicato de magnesio, sílica gel y óxidos de aluminio (tabla III.1).

Tabla III.1. Adsorbentes más comunes en SPE.

Adsorbente	Tipo de fase	Estructura
<i>Octadecilsilano (C18)</i>	Invertida	-Si-(CH ₂) ₁₇ -CH ₃
<i>Octilsilano (C8)</i>	Invertida	-Si-(CH ₂) ₇ -CH ₃
<i>Fenilsilano</i>	Invertida	-Si-Ph
<i>Sílice</i>	Normal	-Si-OH
<i>Cianopropil</i>	Normal	-Si-(CH ₂) ₃ -CN
<i>Diolsilano</i>	Normal	-Si-(CH ₂) ₄ -CHOH-CH ₂ OH
<i>SCX</i>	Cambiador iónico	-Si-(CH ₂) ₃ -SO ₃ ⁻
<i>SAX</i>	Cambiador iónico	-Si-(CH ₂) ₃ -N ⁺ (CH ₃) ₃
<i>CBA</i>	Cambiador iónico	-Si-(CH ₂) ₃ -COO ⁻
<i>Amberlita XAD-2</i>	Polimérica	Poliestireno-divinilbenceno
<i>Bond Elut ENV</i>	Polimérica	Poliestireno-divinilbenceno
<i>Isolute ENV+</i>	Polimérica	Poliestireno-divinilbenceno
<i>LiChrolut EN</i>	Polimérica	Poliestireno-divinilbenceno
<i>Oasis HLB</i>	Polimérica	Divinilbenceno-vinilpirrolidona

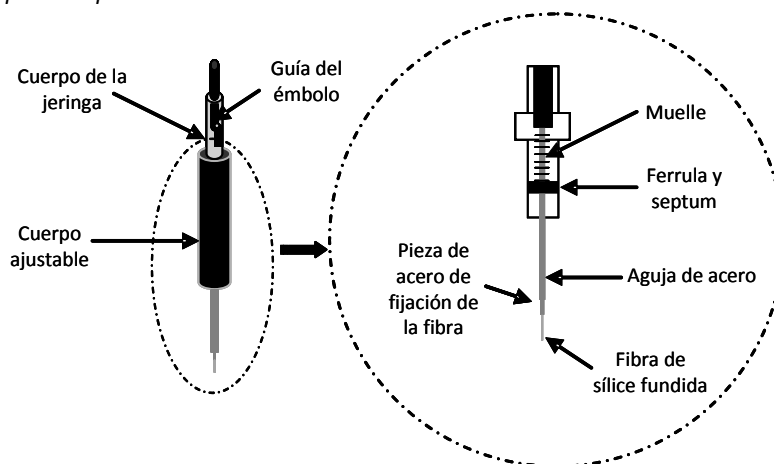
Dentro de las aplicaciones encontradas para los analitos estudiados, la SPE es una de las técnicas de concentración de muestras acuosas más utilizada. Para aguas residuales y superficiales, los polímeros más empleados son sílices funcionalizadas y materiales poliméricos de fase reversa como el C18 [Agüera A; 2003][Mc Avoy D; 2002][Benijts T; 2003] y el Oasis HLB [Singer H; 2002][Halden RU; 2005][Hua W; 2005][Benijts T; 2004]. Además hay alguna aplicación en la que se ha empleado adsorbentes mixtos conteniendo grupos funcionales apolares e intercambiadores aniónicos (por ejemplo, Oasis MAX), para la extracción conjunta de ácidos orgánicos, fenoles, triclosán y parabenos [Lee HB; 2005]. Los eluyentes comúnmente usados son acetato de etilo [Wu JL; 2007][Gómez MJ; 2007][Thomas PM; 2004], acetona [Gibson R; 2007][Paxéus N; 2004], metanol [Lee HB; 2003][Quintana JB; 2004][Nakada N; 2006][Vanderford BJ; 2006][Bendz D; 2005] y acetonitrilo [Heberer T; 1997].

También se ha seleccionado la SPE, combinada *on-line*, con cromatografía de líquidos (LC) para extraer el triclosán y diversos clorofenoles en muestras de orina [Ye X; 2005] y leche materna [Ye X; 2006]. En el caso de los parabenos, existen múltiples estudios en donde la SPE ha sido seleccionada para la extracción de estos aditivos en suspensiones de medicamentos [Rebbeck C; 2006], cosméticos [Shen HY; 2007], colutorios [Kokoletsi MX; 2005] e incluso aire [Rudel RA; 2003].

3.1.3. Microextracción en fase sólida (SPME)

La microextracción en fase sólida es una técnica de preparación de muestra desarrollada por Belardi y Pawliszyn en 1989 [Cámara C; 2002][Pawliszyn J; 1997]. Se basa en la utilización de una fibra de sílice fundida recubierta de una fase adsorbente de naturaleza polimérica (figura III.3). Los analitos presentes en la muestra, por lo general, no se extraen cuantitativamente en la fibra, sino que se establece un equilibrio entre las fases existentes en el vial en el que se lleva a cabo el proceso de extracción [Cela R; 2002]. A diferencia de la SPE, SPME no precisa de disolventes orgánicos y requiere una manipulación mínima de la muestra.

Figura III.3. Dispositivo para SPME.



El proceso de microextracción en fase sólida se desarrolla en dos etapas básicas:

1. *Etapas de extracción:* Se expone la fibra a la muestra contenida en un vial sellado para que se produzca la migración de los analitos desde ésta hasta la fibra durante un tiempo dado.
2. *Etapas de desorción de la fibra de SPME:* Se introduce la fibra en el inyector de un sistema analítico (cromatógrafo de gases o de líquidos) donde los analitos serán desorbidos térmicamente o por disolución en la fase móvil [Cela R; 2002].

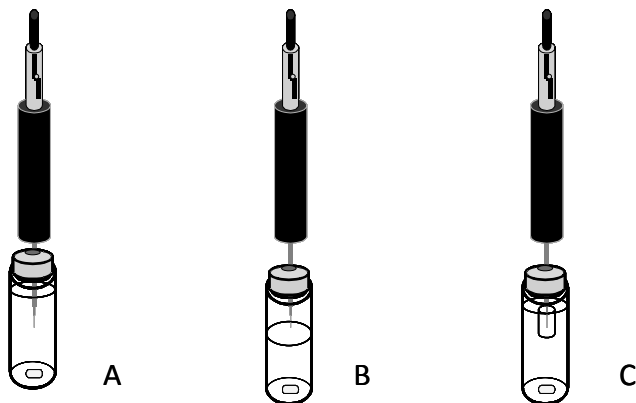
El muestreo puede llevarse a cabo de tres modos diferentes, según las características de los analitos y de la muestra, esquematizados en la figura III.4:

Extracción directa o por inmersión (A): Se introduce la fibra directamente en la muestra líquida, produciéndose la migración directa de los analitos desde la matriz hasta la fibra. Se suele seleccionar cuando las muestras son relativamente sencillas y los analitos poco volátiles.

Extracción en espacio de cabeza (HS-SPME) (B): La fibra es expuesta al espacio de cabeza existente sobre la muestra, de modo que los analitos pasan de la muestra al espacio de cabeza, y de ahí, al recubrimiento polimérico. Es adecuado para compuestos volátiles en matrices que sufren tratamientos drásticos (modificaciones de pH, digestiones ácidas o básicas, etc), siendo además selectivo con respecto a aquellos analitos de elevado peso molecular.

Microextracción en fase sólida indirecta o a través de una membrana (C): Entre la fibra y la muestra, se sitúa una membrana que evita el deterioro que se puede producir al analizar muestras complejas en la modalidad de inmersión [Pawliszyn J; 1997]. Su mayor limitación radica en la existencia de una barrera física entre la muestra y la fibra, que ralentiza enormemente la cinética del proceso de extracción.

Figura III.4. Modos de muestreo en SPME: A) Muestreo directo, B) Muestreo en espacio de cabeza y C) SPME indirecta o con membrana.



La microextracción en fase sólida es una técnica de equilibrio en la que se produce la distribución del analito en las distintas fases existentes en el sistema. Los equilibrios se producen entre el polímero que recubre la fibra y la muestra, el espacio de cabeza y la muestra, y el recubrimiento de la fibra y el espacio de cabeza. En condiciones de equilibrio, el balance de materia anterior se resume en la siguiente ecuación:

$$C_0 V_s = C_h^\infty V_h + C_s^\infty V_s + C_f^\infty V_f$$

donde C_0 es la concentración inicial de analito en la muestra, C_h^∞ , C_s^∞ y C_f^∞ son, respectivamente, la concentración en el espacio de cabeza, en la muestra y en la fibra tras alcanzarse el equilibrio. Por otra parte, V_s es el volumen de muestra, V_h y V_f son los volúmenes del espacio de cabeza y de la fibra.

Los coeficientes de reparto entre las tres fases presentes en el vial de extracción vienen dados por:

$$K_{fh} = \frac{C_f^\infty}{C_h^\infty} \quad K_{hs} = \frac{C_h^\infty}{C_s^\infty} \quad K_{fs} = \frac{C_f^\infty}{C_s^\infty}$$

Así, la cantidad de analito en el recubrimiento de la fibra ($n = C_f^\infty V_f$) se puede expresar como:

$$n = \frac{K_{fh} K_{hs} V_f C_0 V_s}{K_{fh} K_{hs} V_f + K_{hs} V_h + V_s}$$

Cuando se alcanza el equilibrio:

$$K_{fs} = K_{fh} K_{hs}$$

Y sustituyendo en la ecuación anterior:

$$n = \frac{K_{fs} V_f C_0 V_s}{K_{fs} V_f + K_{hs} V_h + V_s}$$

Cuando no existe espacio de cabeza, es decir, la muestra llena por completo el vial de extracción, el término $K_{hs} V_h$ desaparece de la expresión anterior:

$$n = \frac{K_{fs} V_f C_0 V_s}{K_{fs} V_f + V_s}$$

Considerando que el volumen de la muestra acuosa (V_s) es mucho mayor que el volumen del recubrimiento de la fibra (V_f), puede cumplirse que $K_{fs} V_f \ll V_s$, en este caso:

$$n = K_{fs} V_f C_0$$

Esto es, una vez alcanzado el equilibrio, la cantidad de analito extraído será independiente del volumen de muestra y directamente proporcional a su concentración inicial en la muestra, el volumen de fase contenida en la fibra de SPME y la constante de reparto entre la fibra y muestra.

Como se observa en la deducción anterior, la constante de distribución K_{fs} , nos indica que la eficacia de la extracción es dependiente del polímero que recubre la fibra de SPME así como de su espesor, tabla III.2. Una elevada afinidad de la fibra por los analitos es esencial, ya que la matriz y la fibra están compitiendo por las especies [Cela R; 2002].

Desde el punto de vista cinético, la SPME se basa en la *segunda ley de difusión de Fick*, ya que se produce una difusión de los analitos desde el seno de la disolución acuosa a la fase estacionaria que recubre la fibra [Pawliszyn J; 1997][Lord H; 2000].

Cabe destacar que las fórmulas desarrolladas sólo son aptas cuando el polímero que recubre la fibra de SPME es un líquido. Para polímeros sólidos, el tratamiento es análogo cuando se trabaja con concentraciones bajas de analito, ya que el área superficial disponible para la adsorción será proporcional al volumen del recubrimiento, asumiendo que la porosidad es homogénea.

Tabla III.2. Recubrimientos comerciales utilizados, más habitualmente, como fases extractantes en SPME.

Fase estacionaria	Espesor de fase (μm)	Polaridad	T ^a máxima desorción ($^{\circ}\text{C}$)
	100		280
PDMS^a	30	Apolar	280
	7		340
PA^a	85	Polar	320
CW-DVB	65	Polar	260
PDMS-DVB	65	Semipolar	270
CAR-PDMS	75	Semipolar	340
DVB-CAR-PDMS	50/80	Semipolar	270

^aFases poliméricas líquidas

Entre los parámetros que afectan a la eficacia de la SPME, los más importantes son:

Temperatura.- Afecta a la cinética de extracción y a la cantidad de analito sobre la fibra en el equilibrio. Al aumentar la temperatura se acelera la transferencia de materia desde la matriz a la fibra, haciendo que la cinética sea más rápida, mientras que en condiciones de equilibrio, al ser la SPME un proceso exotérmico, disminuye la masa de analito incorporada en la fibra.

Tiempo de extracción.- La SPME es una técnica de equilibrio entre las fases existentes, pero muchas veces es imposible trabajar en estas condiciones. Por ello, desde el punto de vista práctico, se utilizan tiempos menores que el necesario para alcanzar el equilibrio, trabajando entonces en condiciones cinéticas. Es habitual ajustar el tiempo de muestreo a la duración de la etapa posterior de separación cromatográfica.

Efecto salino.- La adición de sales (NaCl, KCl, etc) provoca un aumento de la fuerza iónica, variando entonces las constantes de distribución de los analitos entre la muestra y fibra y con ello, la eficacia del proceso extractivo [Canosa P; 2006 B]. En general, la masa de analito extraída aumenta con la fuerza iónica, aunque cuando la concentración de sal es muy elevada puede provocar el efecto contrario para ciertos compuestos [Lord H; 2000][Canosa P; 2005 B].

pH de la muestra.- Cuando tenemos compuestos con grupos ácidos o básicos, el pH afecta al grado de disociación de los mismos, y por lo tanto a su solubilidad. Para obtener la máxima eficacia de extracción, se ha de trabajar a un pH dos unidades por debajo del pK_a en caso de compuestos ácidos, y dos unidades por encima en caso de los básicos.

Volumen de la muestra.- En general, para especies no iónicas, el volumen de la muestra es mayor que el de la fibra, de modo que la cantidad de especie a extraer puede ser simplemente proporcional a la concentración en la muestra, el volumen de la fibra y el coeficiente de reparto K_{fs} . En ocasiones la cantidad de analito en la fibra aumenta con el volumen de muestra (V_s) hasta que se cumple que $V_s \gg K_{fs} V_f$. A partir de ese momento, la eficacia de extracción no aumenta con el volumen de la muestra, denominándose volumen infinito. En todo caso en SPME es muy poco habitual usar volúmenes de muestra por encima de 100 mL.

Volumen de espacio de cabeza.- Cuando se lleva a cabo el muestreo en la modalidad espacio de cabeza, el volumen del mismo será muy importante, ya que si es muy grande, los compuestos volátiles se diluyen en este, disminuyendo su concentración en la fibra. Además, a menor tamaño del espacio de cabeza, más rápida es la cinética del proceso de extracción.

Agitación de la muestra.- La agitación favorece la difusión de los analitos que se encuentran en la matriz acuosa hasta la fibra, acelerando la cinética de extracción. La influencia de la agitación es especialmente significativa cuanto mayor sea el peso molecular de los compuestos y, sobre todo, cuando se opera en la modalidad de muestreo por inmersión.

Adición de disolvente.- La adición de disolventes orgánicos a muestras acuosas normalmente reduce la cantidad de analito extraída. Sin embargo, para muestras sólidas aumenta la eficacia de extracción, ya que favorece la difusión de los analitos desde la matriz a la fibra [Pawliszyn J; 1997].

Dentro de las aplicaciones de la SPME a muestras acuosas, el análisis de clorofenoles relacionados con el triclosán es el campo que presenta un mayor número de aplicaciones, dentro de los analitos considerados en este estudio. Generalmente, se selecciona el muestreo en espacio de cabeza, para lo cual es necesario incrementar previamente la volatilidad de los compuestos derivatizándolos con anhídrido acético [Barták P; 1997][Llompert M; 2002] o con un agente alquilante como el alquilcloroformiato, compatibles con las muestras acuosas [Henricksen T; 2001]. Las fibras que proporcionan mayor respuesta para estos compuestos derivatizados son PA [Barták P; 1997][Ribeiro A; 2002], PDMS [Henricksen T; 2001][Llompert M; 2002] y CAR-PDMS [Llompert M;

2002], siendo recomendable emplear temperaturas elevadas y adición de sal para mejorar la eficacia de la extracción.

En el caso de los parabenos, la SPME se ha empleado para el análisis de cosméticos mediante espectrometría de movilidad iónica, en donde la fibra triple DVB-CAR-PDMS presentó mejores resultados frente a PDMS, PA y PDMS-DVB [Lokhnauth JK; 2006].

3.2. Preparación de muestra para matrices sólidas

La extracción y recuperación de los analitos en matrices sólidas puede resumirse en cuatro etapas: desorción de los compuestos de los sitios activos de la matriz, difusión de los mismos a través de la matriz, solubilización de los analitos en el extractante y la recolección de los extractos. La interacción entre los analitos y las muestras sólidas suele ser mucho más intensa que en el caso de las matrices líquidas, de modo que es necesario emplear técnicas de extracción más energéticas. En consecuencia, son técnicas poco selectivas, de modo que muchas veces será necesario considerar etapas posteriores de limpieza.

Dentro de las técnicas utilizadas para la extracción de parabenos y triclosán en muestras sólidas, se encuentra la extracción asistida por microondas (MAE), Soxhlet, la extracción por ultrasonidos (US), la dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) y la extracción con disolventes presurizados (PLE) [Camel V; 2001].

3.2.1. Extracción asistida por microondas (MAE)

La extracción asistida por microondas se basa en el uso de la energía de microondas para conseguir que los compuestos de interés pasen de la muestra a un disolvente adecuado. Es una técnica rápida, que utiliza volúmenes pequeños de extractante y que permite el control de una serie de parámetros que afectan a la eficacia de extracción [Camel V; 2000].

El calentamiento inducido por la energía de microondas se fundamenta en la orientación de dipolos sometidos a una radiación electromagnética de frecuencia comprendida entre los 100 MHz y los 3 GHz. En presencia del campo electromagnético, los dipolos se orientan preferentemente en una determinada dirección, volviendo a un estado desordenado cuando el campo cesa. La fricción entre moléculas causada por estos movimientos provoca la emisión de energía calorífica. A 2.5 GHz (frecuencia a la que operan los extractores de microondas), el alineamiento de moléculas polares seguido del correspondiente retorno al estado desordenado, ocurre aproximadamente 5×10^9 veces por segundo, lo cual provoca un calentamiento sumamente rápido.

La aplicación de la energía de microondas puede llevarse a cabo en recipientes sellados (bajo control de presión y temperatura) o en vasos abiertos (presión atmosférica). En el primer caso, el disolvente puede calentarse por encima de su punto de ebullición a presión atmosférica, mientras que usando recipientes abiertos, la temperatura máxima alcanzada corresponderá a la del punto de ebullición del disolvente a presión atmosférica **[Bélanger JMR; 2006]**.

Los parámetros que afectan a la eficacia de la extracción son la naturaleza del disolvente, la temperatura, la potencia, el tiempo de extracción y la naturaleza de la matriz. La temperatura ayuda a aumentar la difusividad de los analitos desde la matriz al disolvente. El efecto de la energía de microondas es fuertemente dependiente de la naturaleza del disolvente y de la matriz. Aquellos disolventes que tienen una elevada constante dieléctrica experimentan una elevada temperatura, aumentando la difusividad de los analitos desde la matriz al disolvente, mientras que los disolventes con una baja constante dieléctrica prácticamente no son calentados, actuando simplemente como solubilizadores de los analitos. En este caso, sólo se calienta la matriz gracias a la presencia de agua en su estructura **[Lettelier M; 1999]**.

La cantidad de energía aplicada es un parámetro a controlar, debido a que puede producir un calentamiento excesivo de la muestra. El tiempo de extracción también es estudiado, debido a que valores excesivamente largos podrían causar la degradación de compuestos termolábiles. La mayoría de estos parámetros pueden optimizarse mediante diseños de experimentos, lo que permite establecer las condiciones óptimas con un menor número de ensayos, reduciendo tiempo, trabajo y considerando las posibles interacciones que pueden tener varios factores entre sí **[Egizabal E; 1998]**.

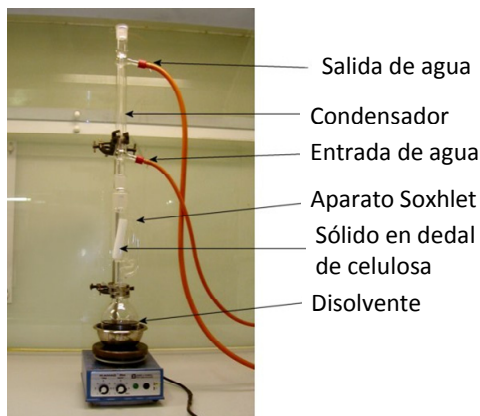
Por otra parte, las características de la matriz también pueden provocar variaciones en la recuperación de los compuestos, sobre todo en matrices con alto contenido en materia orgánica, debido a interacciones analito-matriz **[Camel V; 2000 y 2001]**. Así, Mahugo-Santana y colaboradores **[Mahugo-Santana C; 2005]** observaron que la naturaleza del suelo afectó significativamente a la extracción de clorofenoles mediante extracción micelar asistida por microondas. A mayor contenido de materia orgánica, se observó un descenso de la recuperación de los mononitrofenoles y un aumento de la señal de los alquilfenoles. Además, la eficacia de extracción de los clorofenoles resultó más eficaz en aquellos suelos de naturaleza ácida.

En la mayoría de las aplicaciones, es necesario llevar a cabo la purificación del extracto obtenido debido a la escasa selectividad de esta técnica. Rice y colaboradores **[Rice SL; 2007]** desarrollaron una metodología para la extracción de diversos compuestos utilizados en productos de cuidado personal, entre los cuales se encontraba el triclosán, en muestras de suelo y sedimentos. La extracción, realizada con una mezcla de diclorometano:metanol (2:1), a 115 °C, durante 15 minutos, proporcionó extractos que tuvieron que ser purificados con sílica previamente a su análisis mediante GC-MS.

3.2.2. Extracción Soxhlet

Soxhlet es la técnica más antigua para la extracción de compuestos orgánicos en matrices sólidas. Desarrollada en 1879, sigue siendo hoy en día una técnica aceptada por la Agencia de Protección Medioambiental (EPA), como el método 3540C, y usada como procedimiento de referencia con respecto al que se validan otras técnicas más actuales [Fidalgo-Used N; 2007].

Figura III.5. Equipo de extracción Soxhlet.



La extracción exhaustiva de componentes orgánicos en un sistema Soxhlet se lleva a cabo usando un disolvente orgánico, el cual refluye a través de la muestra contenida en un dedal poroso de celulosa o vidrio, figura III.5. Las ventajas más importantes de la extracción Soxhlet son el contacto continuo de la muestra con una porción fresca de disolvente, simplicidad, bajo coste de adquisición y la posibilidad de procesar grandes cantidades de muestra.

Dentro de sus limitaciones, nos encontramos el tiempo necesario para la extracción y los volúmenes de disolvente, en general muy elevados frente otras técnicas, lo que implica la necesidad de concentrar los extractos orgánicos obtenidos [Luque de Castro MD; 1998].

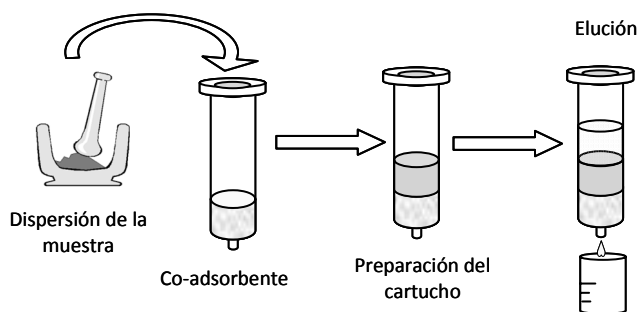
En lo referente a la familia de compuestos estudiados, se han encontrado aplicaciones de la extracción Soxhlet para triclosán y metiltriclosán en lodos de depuradora, sedimentos y algas. Para el caso de lodos, se ha utilizado acetato de etilo durante 6 horas. Los extractos fueron purificados mediante cromatografía de permeación en gel (GPC) para eliminar las macromoléculas co-extraídas [Bester K; 2003]. Para las algas el protocolo fue el mismo pero se ha utilizado diclorometano en vez de acetato de etilo como disolvente de extracción [Coogan MA; 2007].

La combinación del procedimiento Soxhlet con el uso de energía de microondas permite realizar extracciones mucho más rápidas con la misma eficacia que un Soxhlet convencional. Morales-Muñoz y colaboradores [Morales-Muñoz S; 2005] utilizaron esta combinación para extraer contaminantes como el bisfenol A, el estradiol y el triclosán de sedimentos marinos. En sólo 5 ciclos de extracción de 120 segundos, usando 35 mL de diclorometano a 100 W de potencia, extrajeron los compuestos cuantitativamente. Con la metodología Soxhlet convencional fueron necesarios 100 mL de diclorometano y 24 horas para obtener resultados equivalentes.

3.2.3. Dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD)

La dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) es una técnica de preparación de muestra con una gran aceptación para la extracción de compuestos orgánicos en matrices sólidas o semisólidas. Desarrollada en 1989 por Barker [Barker SA; 1989], MSPD se basa en la ruptura de la estructura de la matriz con ayuda de un mortero y la homogenización de la misma sobre un soporte sólido. El dispersado es transferido a un cartucho, normalmente de polipropileno, y los analitos son eluidos con un disolvente apropiado (figura III.6).

Figura III.6. Esquema del proceso de MSPD.



La partición (fase estacionaria líquida) o el equilibrio de adsorción (fase estacionaria sólida), similar al existente en una columna cromatográfica, es responsable de la distribución de los analitos entre la muestra dispersada y el disolvente de elución. La eficacia y selectividad en MSPD depende de varios factores entre los cuales destacan la selección del material dispersante, utilización de co-adsorbentes, el tipo de disolvente y la secuencia de elución.

Naturaleza del soporte sólido y de la fase enlazada.- Los materiales derivados de la sílica son los más empleados en la ruptura de la matriz en MSPD, ya que presentan la ventaja de poseer grupos silanoles no enlazados, tanto en la superficie de las partículas como en los poros, que interactúan con el agua de la muestra, actuando a su vez como agente desecante.

Dentro de los adsorbentes denominados de fase reversa, el más empleado es el octadecil-silano (C18), frente a otros como el C8 y el C30. El C18 está formado por partículas de sílice con cadenas hidrocarbonadas de 18 carbonos, unidas químicamente a los grupos silanoles. Las partículas de sílice actúan como dispersantes, mientras que el C18 solubiliza los componentes de la matriz sobre su superficie. Con este tipo de fases es posible obtener extractos relativamente libres de grasas para muestras de músculo [Kubala-Drinic H; 2003][Le Boulaire S; 1997], hígado [Crescenzi C; 2001][Horne

C; 1998], riñón **[Ruiz MJ; 2005]** y pescados con alto contenido lipídico **[Tolls J; 1999][García-Reyes JR; 2007][Canosa P; 2008]**, usando acetonitrilo como disolvente.

En la actualidad, las fases reversas basadas en las cadenas hidrocarbonadas se están sustituyendo por amino-propil-sílica o por aminas primarias-secundarias (PSA) **[García-Reyes JF; 2007][Ferrer C; 2005][Cunha SC; 2007]** para reducir el contenido de lípidos en los extractos procedentes de muestras biológicas de origen animal.

El Florisil (MgSiO₃), la alúmina (Al₂O₃) y la sílica (SiO₂) son adsorbentes denominados de fase normal utilizados para la extracción de pesticidas, herbicidas y contaminantes prioritarios en matrices biológicas **[Gómez-Ariza JL; 2002][Martínez A; 2005]**, vegetales y frutas **[Hu YY; 2006]** mediante MSPD. Además, se han usado como dispersantes de muestras medioambientales (lodos de depuradora, sedimentos, polvo de aspiradora,...) para la extracción de contaminantes tanto prioritarios como emergentes **[Pena MT; 2007][Blanco E; 2006][Shen X; 2006]**. Estos adsorbentes pueden ser utilizados tal como se encuentran comercialmente o modificados mediante la adición de agua, ácidos o bases en función de las características y el comportamiento que queramos conferirles **[Carro MA; 2005]**.

Co-adsorbente.- En muchos casos es posible obtener extractos libres de impurezas mediante la purificación *on-line* del extracto primario obtenido en MSPD. Esto puede lograrse colocando una capa de co-adsorbente, generalmente de distinta naturaleza que el sólido utilizado para dispersar la muestra, al fondo del cartucho de MSPD. En muchos casos, este co-adsorbente actúa reteniendo las interferencias **[Pensado L; 2005]**, pero también puede destruirlas cuando presenta algún tipo de modificación química **[Carro MA; 2005][Canosa P; 2008]**.

Naturaleza de la matriz de la muestra.- Los componentes de la matriz dispersada se mueven a través de la fase cromatográfica, contenida en el cartucho de MSPD, lo que hace posible un fraccionamiento en función de la naturaleza de estos compuestos presentes en la matriz, así como de las sustancias interferentes que pueden hacer más complicado su determinación analítica.

Disolvente y secuencia de elución.- Al igual que en cromatografía o en SPE, la polaridad del disolvente es de gran importancia a la hora de determinar que analitos eluyen del cartucho de MSPD y en que orden lo hacen. La correcta elección del disolvente y el diseño del perfil de elución permite obtener extractos libres de impurezas en base a la retención de las mismas en la fase estacionaria **[Pensado L; 2005]**, o mediante una primera elución para eliminarlas del cartucho de MSPD **[Canosa P; 2007 B][García M; 2007]**.

3.2.4. Extracción con disolventes presurizados (PLE)

La extracción con disolventes presurizados, también denominada extracción acelerada con disolventes (ASE), fue comercializada por la compañía *Dionex* en 1995 **[Fidalgo-Used N; 2007]**. PLE es

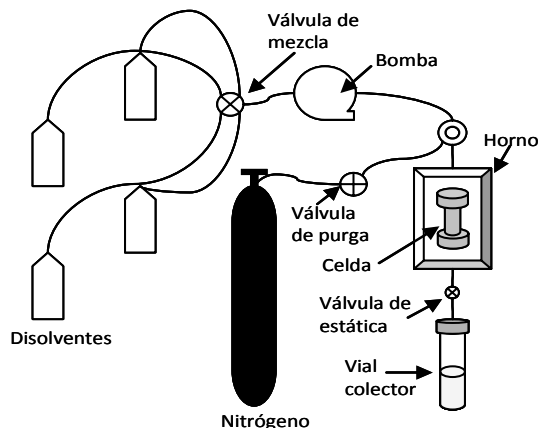
una técnica de extracción sólido-líquido que combina la utilización de temperaturas (50-200°C) y presiones elevadas (500-3000 psi), con disolventes en estado líquido para proporcionar una extracción rápida y eficaz de los analitos desde distintos tipos de matrices, contenidas en una celda de acero sellada [Garrido-López A; 2005]. Se ha demostrado que esta técnica es equivalente a otras metodologías como Soxhlet, siendo incluso utilizada como método de referencia por la Agencia de Protección Medioambiental (US EPA Method 3545). La presión elevada es necesaria para mantener el disolvente en estado líquido a las temperaturas de trabajo, normalmente superiores a su punto de ebullición a presión atmosférica. A estas temperaturas, ligeramente inferiores al punto crítico, las propiedades del disolvente se modifican, de modo que su viscosidad disminuye, penetrando con facilidad en los poros de la matriz, favoreciendo la difusión de los analitos. De este modo, la eficacia de extracción se incrementa, minimizando el volumen de disolvente empleada [Richter BE; 1996].

El tipo de disolvente y la temperatura de trabajo son los parámetros que más afectan a la eficacia de PLE. El disolvente debe ser capaz de solubilizar los analitos sin arrastrar el resto de los componentes de la matriz. Por su parte, la temperatura tiene que ser suficientemente elevada como para aumentar las recuperaciones y favorecer la cinética de extracción, sin degradar a los compuestos objeto de estudio [Concha-Graña E; 2004][Rodil R; 2006]. Otros factores a estudiar a la hora de desarrollar un método de PLE son el número de ciclos, el tiempo de extracción y secado, y en menor medida la presión en las celdas de extracción, aunque, en general, este último no es un parámetro que afecte en gran medida a la eficacia de extracción, de modo que puede ser fijado de antemano [Camel V; 2001].

En la extracción en modo estático, el disolvente es introducido en la celda, manteniéndola a presión constante durante un tiempo predeterminado. Tras esta etapa, la celda se vacía recogiendo todo el extracto en un vial colector. A continuación, se hace pasar un volumen de disolvente, el cual viene expresado como tanto por ciento del volumen de celda (porcentaje de *flush*) para arrastrar posibles trazas de los analitos que pudiesen quedar en la celda. Ese volumen, en el caso de que se produzcan dos o más ciclos de extracción, es dividido entre el número de los mismos [Richter BE; 1996]. Algunos equipos de PLE poseen una válvula restrictora que permite realizar la extracción en modo dinámico, de modo que está pasando continuamente un flujo constante de disolvente a través de la celda presurizada. En este caso, la extracción es más efectiva, pero presenta el inconveniente de obtener extractos con un volumen elevado [Camel V; 2001].

El esquema de un equipo de extracción con disolventes presurizados se muestra en la figura III.7.

Figura III.7. Equipo de extracción con disolventes presurizados.



Los equipos de PLE constan de una bomba para impulsar el disolvente, un horno donde se introducen las celdas de acero presurizadas, para mantenerlas a la temperatura seleccionada, un vial colector en donde se recoge el extracto líquido, y nitrógeno para purgar la celda una vez terminado el proceso de extracción.

La aplicación de esta metodología a la extracción de triclosán y metiltriclosán en muestras sólidas se ha centrado en sedimentos y lodos de depuradora. La muestra es mezclada con un sólido, generalmente un soporte inerte (arena o hidromatrix), para rellenar todo el volumen de la celda. La utilización de diclorometano, como disolvente para la extracción, a 100°C durante 5 minutos, proporciona recuperaciones del orden del 100 % para el triclosán [Agüera A; 2003][Singer H; 2002][Chu S; 2007] y el metiltriclosán [Singer H; 2002]. Burkhardt y colaboradores [Burkhardt MK; 2005] seleccionaron mezclas polares de agua:isopropanol a 120°C y 200°C para la extracción de contaminantes antropogénicos, entre los cuales se encontraba el triclosán, en sedimentos. PLE ha sido aplicada también a la determinación de triclosán y metiltriclosán en pescado, seleccionando una mezcla de ciclohexano:diclorometano (1:1) para la extracción de los analitos, conjuntamente con la fracción lipídica, y posterior purificación por cromatografía de permeación en gel (GPC) [Balmer ME; 2004 y 2005].

3.2.5. Ultrasonidos (US)

Es una técnica sencilla de extracción sólido-líquido (US EPA 3550), en donde la muestra se pone en contacto con un disolvente adecuado, y se somete a los ultrasonidos generados en un baño de agua o por una sonda de ultrasonidos. De este modo, se produce la agitación continua de la matriz con el disolvente orgánico. El efecto mecánico de los ultrasonidos provoca una mayor penetración del disolvente en los materiales sólidos, facilitando la transferencia de los analitos de la matriz al disolvente. Una vez finalizada la etapa de sonicación, se centrifuga la muestra y el sobrenadante se trata de modo adecuado para realizar el análisis. La elección del disolvente es esencial para que el

método permita obtener elevadas recuperaciones de los analitos de interés [Fidalgo-Used N; 2007][Cela R; 2002].

Debido a su sencillez, esta técnica es utilizada ampliamente en la extracción de parabenos en cosméticos [Labat L; 2000][Zhang Q; 2005], siendo seleccionada en la Directiva 96/45/EC de la Unión Europea como método de referencia para verificar la composición en productos de cuidado personal [Shen HY; 2007][<http://eur-lex.europa.eu>]. También se han desarrollado metodologías de extracción de triclosán y parabenos en matrices medioambientales basadas en el uso de energía de ultrasonidos. Así, Rudel y colaboradores [Rudel RA; 2003] determinaron la presencia de diferentes parabenos en muestras de polvo, previamente sometidas a una etapa de lixiviación en medio ácido, mediante sonicación en presencia de diclorometano. Gatidou [Gatidou G; 2007] extrajo lodos de depuradora con una mezcla de metanol y agua para la determinación de triclosán y otros contaminantes emergentes. El extracto obtenido tras la sonicación fue purificado mediante SPE.

3.3. Derivatización

La derivatización es una operación orientada hacia la transformación de los analitos en otras especies más compatibles con la técnica de determinación, o que presenten mejores características para su detección [Mol HGJ; 2002][Rodríguez I; 2000][Blau K; 1993]. En el caso de usar técnicas cromatográficas en la etapa de determinación, los objetivos concretos de los procesos de derivatización son:

1. Mejorar la estabilidad térmica de los analitos
2. Mejorar la resolución cromatográfica entre picos
3. Modificar indirectamente la sensibilidad del detector, introduciendo en las moléculas grupos orgánicos adecuados que incrementan su respuesta [Cela R; 2002].

3.3.1. Derivatización en medio homogéneo

La derivatización en medio homogéneo es aquella en la cual el agente derivatizante se adiciona directamente al medio o disolvente que contiene el analito. Según la forma experimental de llevar a cabo el proceso, podemos hablar de:

Derivatización discontinua u off-line.- La derivatización se realiza previamente a la introducción de los analitos en el sistema cromatográfico.

Derivatización en continuo u on-line.- La derivatización se realiza en el propio sistema cromatográfico [Cela R; 2002].

En el caso concreto de la cromatografía de gases, la modalidad más utilizada es la derivatización *off-line*, con distintos tipos de reacciones entre las que destacan las siguientes para compuestos fenólicos:

Acetilación.- Se lleva a cabo utilizando anhídrido acético y una base, en medio acuoso u orgánico [Henriksen T; 2001]. Adolfsson-Erici, Sioufi y Birkel han seleccionado esta reacción para derivatizar el triclosán en extractos de leche humana, orina y plasma [Adolfsson-Erici M; 2002][Sioufi A; 1997][Birkel M; 1993]. Del mismo modo, los extractos obtenidos de muestras de corcho y barrica de roble para el análisis de anisoles y 2,4,6-triclorofenol, fueron derivatizados con este reactivo para ser determinados posteriormente en un sistema GC-ECD [Pizarro C; 2006 A y B].

Metilación.- Una de las opciones más utilizadas a la hora de derivatizar el triclosán es la metilación con diazometano. Este agente derivatizante presenta varios inconvenientes como la necesidad de generarse *in-situ*, es carcinogénico y da lugar a una reacción muy exotérmica [Hell K; 2000][Blau K; 1993]. Por lo general, el diazometano no es compatible con el disolvente que contiene las especies a derivatizar, siendo necesaria la evaporación a sequedad del extracto antes de añadir este derivatizante, así como eliminar el exceso del mismo al finalizar la reacción [Ternes TA; 2002], además de no permitir la distinción entre el triclosán y su anisol (metiltriclosán) presente en la muestra [Singer H; 2002]. Aún así, varios autores han utilizado la metilación como reacción de derivatización del triclosán. La mayoría de ellos utilizaron diazometano [Lindstrom A; 2002][Kanda R; 2003][Alaee M; 2003][Nakada N; 2006][Graovac M; 1995][Agüera A; 2003][Okumura T; 1996][Kronimus A; 2004], aunque algunos han recurrido a otros reactivos como el metil clorometanoato [Weigel S; 2004][Bendz D; 2005][Paxéus N; 2004].

Sililación.- Sin duda es la reacción más versátil a la hora de determinar sustancias con grupos ácidos utilizando cromatografía de gases. Mediante la formación del enlace silicio-oxígeno, se bloquean las interacciones dipolo-dipolo reduciendo la polaridad de aquellas especies con grupos hidroxilos o carboxilos. La derivatización debe realizarse en medio orgánico, empleando disolventes no próticos [Blau K; 1993]. Algunos autores han seleccionado esta reacción, utilizando diversos agentes sililantes entre los que destacan el N,N-dietiltrimetilsililamina [Mc Avoy D; 2002], el N,O-bis-(trimetilsilil)trifluoroacetamida [Boyd GR; 2003 y 2004][Lee HB; 2005], el N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida [Ternes TA; 2002] y el N-(tert-butildimetilsilil)-N-metiltrifluoroacetamida [Quintana JB; 2007][Heberer T; 1997][Canosa P; 2005 B y 2006 A].

Formación de pentafluorobencil y pentafluoropropionil derivados.- Esta reacción se lleva a cabo con los correspondientes bromuros alquilfluorados, dando lugar a compuestos altamente estables [Allmyr M; 2006 B][Lee HB; 2005][Rule KL; 2005] y fácilmente detectables mediante ECD ó espectrometría de masas empleando ionización química en modo negativo.

3.3.2. Derivatización combinada con SPME

En los procesos de microextracción en fase sólida (SPME), la derivatización puede llevarse a cabo de distintas maneras.

Derivatización directa sobre la muestra.- La derivatización se produce en el vial que contiene la muestra, de modo que las formas derivatizadas son las extraídas por la fibra de SPME. En varias referencias se utiliza este modo de derivatización. Por ejemplo, la determinación de más de 30 fenoles en agua mediante HS-SPME ha sido llevado a cabo utilizando anhídrido acético para acetilar los compuestos en disolución acuosa [Llompert M; 2002]. Esta estrategia de análisis había sido utilizada también por Barták [Barták P; 1997].

Derivatización sobre la fibra de SPME o derivatización on-fiber.- La derivatización *on-fiber* se puede realizar incorporando, previamente al muestreo, el derivatizante en la fase polimérica de la fibra de SPME, de modo que el proceso de extracción y derivatización tienen lugar de manera simultánea. Esta modalidad de trabajo necesita que el derivatizante sea estable cuando se pone en contacto con la muestra. A continuación, enumeramos algunos trabajos que aplican esta metodología.

Tsai y colaboradores [Tsai SW; 2003] expusieron la fibra a O-2,3,4,5,6-(pentafluorobencil)hidroxilamina, para determinar aldehídos en una muestra acuosa mediante HS-SPME. Koster y colaboradores [Koster EHM; 2002] emplearon la derivatización *on-fiber*, exponiendo la fibra previamente al agente derivatizante (cloruro de pentafluorobenzoilo) para la posterior extracción de anfetaminas en muestras de orina mediante SPME por inmersión.

Cuando la derivatización se realiza después de la etapa de extracción, la fibra conteniendo los analitos se expone al espacio de cabeza de un vial donde se sitúa el derivatizante. En general, este método se utiliza para especies poco volátiles presentes en muestras acuosas, usando agentes derivatizantes que se degradan en contacto con agua [Rodríguez I; 2004].

Shao y colaboradores [Shao Y; 2003] aplicaron la derivatización *on-fiber* al análisis de trans-resveratrol, un compuesto fenólico, en vino, frutas y soja. Tras el muestreo mediante inmersión, derivatizaron el analito con bis-(trimetilsilil)trifluoroacetamida.

La determinación de monoésteres de ácidos ftálicos mediante SPME por inmersión y posterior derivatización *on-fiber* con diazometano fue llevada a cabo por Alzaga y colaboradores [Alzaga R; 2003]. En su trabajo, observaron que la exposición de las fibras de CW-DVB a los vapores de diazometano dañaba gravemente dicho recubrimiento. Engelmann y colaboradores [Engelmann MD; 2003] también escogieron esta metodología para determinar clenbuterol en agua. Tras el

muestreo por inmersión con la fibra de PA, ésta fue expuesta a un vial conteniendo hexametildisilazano. Musshoff y colaboradores [Musshoff F; 2002] propusieron un método similar para la determinación de cannabinoides en pelo. Tras una digestión básica, extrajeron los analitos mediante HS-SPME y posteriormente expusieron la fibra a N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida [Musshoff F; 2002]. Brown y colaboradores [Brown H; 2003] derivatizaron anfetaminas presentes en fluidos biológicos con diferentes alquilcloroformiatos, utilizados específicamente para especies con grupos amino, transformándolos en los correspondientes carbamatos. Rodríguez y colaboradores [Rodríguez I; 2004] analizaron fármacos ácidos mediante SPME por inmersión y posterior derivatización *on-fiber* con N-(tert-butildimetilsilil)-N-metiltrifluoroacetamida.

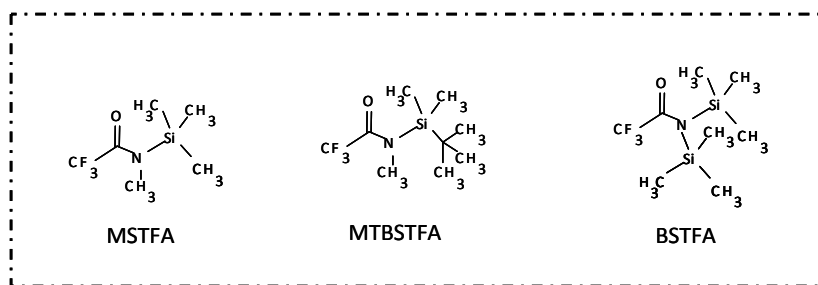
Derivatización en el puerto de inyección.- En esta modalidad, la derivatización tiene lugar en el inyector del cromatógrafo de gases cuando los analitos y el reactivo derivatizante, presentes en la fibra, se someten a altas temperaturas durante la etapa de desorción [Cela R; 2002].

3.3.3. Uso de agentes sililantes como reactivos de derivatización

La utilización de agentes sililantes como derivatizantes de compuestos con grupos -OH, -NH₂ y -SH es muy habitual, ya que el silicio tiene una gran afinidad por estos heteroátomos [Heberer T; 1997]. La reacción puede llevarse a cabo en medio orgánico, a temperatura moderada, siempre que el disolvente empleado no contenga los grupos anteriormente descritos que consumirían el derivatizante [Bester K; 2003][Musshoff F; 2002].

Entre los agentes sililantes más utilizados se encuentran el bis-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA), el N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA) y el N-(tert-butildimetilsilil)-N-metiltrifluoroacetamida (MTBSTFA) (figura III.8).

Figura III.8. Estructura de los principales agentes sililantes utilizados para la derivatización de los compuestos estudiados.



Diversos autores han seleccionado estos reactivos para la determinación de triclosán, clorofenoles o parabenos mediante cromatografía de gases, tabla III.3. Para el desarrollo de las distintas metodologías descritas en esta memoria, se ha utilizado el MTBSTFA como derivatizante. Este reactivo presenta una gran ventaja frente a otros agentes sililantes: el grupo tert-butil, con un gran impedimento estérico, evita la hidrólisis de los enlaces oxígeno-silicio, lo que hace que los derivados obtenidos sean relativamente estables frente a la humedad [Heberer T; 1997][Spaulding RS; 2002]. Además, en comparación con otros agentes sililantes, presenta bajo tiempo de reacción y normalmente ésta puede ser llevada a cabo a temperatura ambiente [Blau K; 1993].

Otra ventaja a destacar de este agente derivatizante, es la mayor estabilidad que presentan las fibras de SPME a los vapores del MTBSTFA, en comparación con otros agentes sililantes más volátiles [Rodríguez I; 2004].

Tabla III.3. Resumen de aplicaciones empleando agentes sililantes como derivatizantes de los compuestos estudiados.

BSTFA			
Analito	Matriz	Condiciones derivatización	Autor
Varios PPCPS, TCS	Lodos depuradora	50 µL derivatizante + 50 µL piridina al residuo seco, 65°C, 20 minutos	Garidou G; 2007
Varios PPCPs, TCS	Aguas superficiales y residuales	1 mL derivatizante al extracto evaporado, 80°C, 20 minutos	Boyd GR; 2003 y 2004
Contaminantes orgánicos, MeP, EtP, BuP	Polvo y Aire	----	Rudel RA; 2003
PPCPs, TCS	Sedimentos y suelos	Piridina:derivatizante (2:1) al residuo seco, 70°C, 20 minutos	Rice SL; 2007
MSTFA			
Analito	Matriz	Condiciones derivatización	Autor
Clorofenoles	Agua	50 µL de extracto + 50 µL derivatizante, 25°C, 60 minutos	Heberer T; 1997
MTBSTFA			
Analito	Matriz	Condiciones derivatización	Autor
Fármacos, estrógenos, fenoles, TCS	Agua residual	50 µL derivatizante + 10 µL piridina al residuo seco, 60°C, 30 minutos	Gibson R; 2007
Fármacos ácidos, TCS	Agua residual y natural	75 µL derivatizante + 75 µL extracto en acetonitrilo, 75 °C, 30 minutos	Lee HB; 2005

MTBSTFA			
Analito	Matriz	Condiciones derivatización	Autor
TCS	Agua consumo	20 µL derivatizante + 20 µL extracto en nonano, 25 °C, 60 minutos	Shelver WL; 2007
TCS; 2,4-DCF; 2,4,6-TCF	Agua residual	20 µL derivatizante + 500 µL extracto en acetato de etilo, 25 °C, 5 minutos	Quintana JB; 2007
Clorofenoles	Agua	50 µL de extracto + 50 µL derivatizante, 25°C, 1h	Heberer T; 1997

3.4. Determinación

Entre las distintas técnicas empleadas para la separación y determinación de los compuestos estudiados, las más habituales son la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y, en menor medida, con sistemas de detección de captura electrónica y emisión atómica; y la cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta-visible o en combinación con espectrometría de masas.

3.4.1. Cromatografía de gases

La cromatografía de gases (GC) se basa en la distribución de los analitos entre una fase estacionaria, depositada en la columna cromatográfica, y una fase móvil o gas portador. La mayoría de las aplicaciones a la determinación de los analitos de interés utilizan columnas con fase 5 % difenil 95 % dimetilsiloxano de 30 m de longitud, comercialmente conocidas como HP-5 o DB-5, [Agüera A; 2003][Zhao RS; 2007], con diámetros internos comprendidos entre 0.25 mm y 0.32 mm, y espesores de fase de 0.25 µm [Balmer ME; 2004][Adolfsson-Erici M; 2002]. Normalmente, se utiliza inyección en modo splitless [Singer H; 2002], aunque algunos autores han considerado el empleo de inyectores de temperatura programada [Beste K; 2003 y 2005] para mejorar los límites de cuantificación obtenidos. Dentro de los distintos detectores utilizados para la determinación de los compuestos estudiados, los más selectivos son el detector de captura electrónica (ECD) y el detector de emisión atómica (AED).

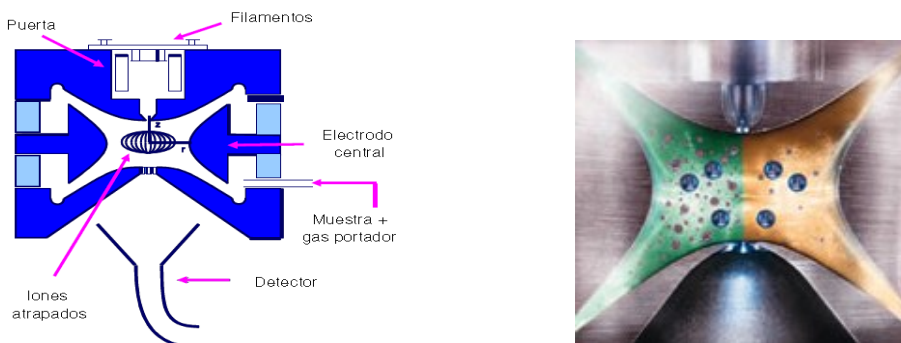
El ECD proporciona una respuesta selectiva hacia las moléculas que poseen átomos electronegativos como el triclosán, metiltriclosán y clorofenoles [Birkel M; 1993][Graovac M; 1995][Sioufi A; 1997]. Evidentemente, carece de interés para parabenos. El detector de emisión atómica (AED) permite la detección de la radiación emitida por los diferentes elementos presentes en los analitos separados por la columna cromatográfica. El plasma alimentado por helio, e inducido por microondas, consigue excitar a los átomos, dando lugar a un espectro de emisión que será detectado

por una red de diodos. Muy pocos autores han seleccionado esta técnica para determinar triclosán en muestras de agua residual [Van Stee LLP; 1999] debido a sus elevados límites de detección para especies cloradas. Sin embargo, ha sido utilizada como técnica de detección en la determinación de triclosán en placa dental [Rasmussen HI; 1996].

Sin duda, la técnica más utilizada hoy en día para la determinación de compuestos orgánicos a niveles traza es la cromatografía de gases combinada con la espectrometría de masas (GC-MS). Mediante esta técnica es posible obtener registros tridimensionales, es decir, para cada tiempo de retención, obtenemos un espectro de masas de las especies que emergen de la columna cromatográfica.

El analizador de masas utilizado durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral es una trampa de iones. El efluente cromatográfico llega a la fuente de ionización, en este caso de impacto electrónico, consistente en un filamento de wolframio que emite electrones acelerados gracias a un potencial aplicado entre el filamento y el ánodo, figura III.9. Este chorro de iones impacta perpendicularmente con las moléculas neutras procedentes de la columna cromatográfica provocando su ionización. Las especies ionizadas pasan al analizador de masas que se encuentra a alto vacío (10^{-5} psi), para evitar la colisión y reconstrucción de los fragmentos cargados, sometiéndolos a una corriente de radiofrecuencias por parte del electrodo anular, que estabiliza la trayectoria de un fragmento con una determinada masa/carga (m/z) en una órbita circular, mientras que los restantes fragmentos colisionan con los electrodos colectores conectados a tierra. Cuando el potencial varía, esos fragmentos se desestabilizan de su órbita y pasan al detector, un multiplicador de electrones, donde se intensifica la señal debido a la cascada de electrones que se genera en cada colisión. En cada barrido, se registra un espectro de masas completo del efluente cromatográfico [Cela R; 2002][Skoog DA; 1994].

Figura III.9. Trampa de iones utilizada como analizador en el espectrómetro de masas.



Otra posibilidad que tenemos dentro de la espectrometría de masas es realizar una refragmentación de los iones primarios. La espectrometría de masas en tándem (MS/MS) con trampa de iones, acoplada a GC, se ha convertido en la herramienta analítica más popular para el análisis de matrices complejas debido a su alta especificidad y moderado coste. La identificación de los analitos se basa en los tiempos de retención y la fragmentación específica de cada ión precursor aislado en la trampa. La espectrometría de masas en tándem proporciona:

- *Mayor información estructural de los analitos*, debido a la obtención del espectro de los iones producto.
- *Incremento de la relación señal-ruido*, eliminando posibles interferencias que pudiesen existir en el espectro de masas.

Existen varios tipos de barridos para la obtención de espectros de MS/MS, aunque el más utilizado para el análisis de muestras medioambientales es la formación de iones producto. Éstos se generan por disociación inducida por colisión (CID) del ión precursor cuando se somete a colisiones sucesivas con helio en la trampa. Normalmente, esas colisiones son poco energéticas, pero la energía transicional del ión precursor aumenta, convirtiendo la energía cinética en energía vibracional. Cuando el ión precursor adquiere una gran cantidad de energía vibracional, los enlaces pueden romperse, formando especies de menor relación m/z.

Dentro de las aplicaciones de GC a la determinación de triclosán, parabenos y compuestos relacionados, lo más habitual es utilizar espectrometría de masas con ionización mediante impacto electrónico, registrando los cromatogramas de corriente iónica total TIC (total ion current) [Sanches-Silva A; 2005][Lores M; 2005][Allmyr M; 2006 A y B], en modo SIM (single ion monitoring) [Bester K; 2005][Coogan MA; 2007][Lee HB; 2005] o empleando MS/MS [Singer H; 2002][Wu JL; 2007].

3.4.2. Cromatografía de líquidos

La cromatografía de líquidos (LC) se basa en la distribución de los analitos entre una fase estacionaria y una fase móvil líquida. Es una técnica ampliamente utilizada para la determinación de triclosán y parabenos. En general se suelen emplear fases estacionarias de naturaleza apolar, del tipo C18 [Ye X; 2005][Ganzera M; 2006], C8 [Zhang Q; 2000][Agüera A; 2003] o fenil-hexil [Quintana JB; 2004] y mezclas metanol:agua o acetonitrilo:agua, con algún modificador tipo ácido acético [Halden RU; 2005][Labat L; 2000], acetato amónico [Kokoletsi MS; 2005] o tributilamina [Quintana JB; 2004], como fases móviles. Los sistemas de detección habitualmente empleados son ultravioleta-visible y espectrometría de masas o masas-masas. La detección mediante espectroscopía ultravioleta-visible se ha utilizado principalmente para la determinación de parabenos en cosméticos [Borremans M;

2004][Labat L; 2000], seleccionando la longitud de onda de 254 nm para registrar los cromatogramas. En el caso de muestras medioambientales, la espectrometría de masas y la espectrometría de masas en tándem son las opciones más utilizadas para la determinación tanto de triclosán como de parabenes [Ganzer M; 2006][Chu S; 2007]. Normalmente, la ionización se realiza mediante electrospray en modo negativo (ESI-). Benijts [Benijts T; 2003] comparó varias de las fuentes más usadas en LC-MS: la ionización química a presión atmosférica (APCI), el electrospray (ESI) y la ionización con spray iónico (SSI) para la determinación de 20 disruptores endocrinos, entre los cuales se encontraban los parabenes. Los resultados que obtuvieron mostraron un patrón de fragmentación y una sensibilidad similar para todas ellas, aunque APCI produjo espectros con peor relación señal/ruido.

Por último, cabe destacar el uso de técnicas como la electrocromatografía capilar [Huang HY; 2004], un híbrido entre la cromatografía líquida de alta resolución y la electroforesis capilar, y la electroforesis micelar electrocinética o electrocromatografía micelar [Mahuzier PE; 2001][Han F; 2008], para el análisis de parabenes en cosméticos y alimentos.



CAPÍTULO II

I. MEDIOS EXPERIMENTALES GENERALES

1.1. Compuestos y materiales utilizados

1.1.1. Reactivos y disolventes

- Agua ultrapura (Milli Q).
- Disolventes: n-hexano, diclorometano y acetona para análisis de trazas, Merck; acetato de etilo, acetonitrilo y metanol grado HPLC, Merck.
- Ácidos y bases: ácido clorhídrico (36 %), Prolabo; ácido sulfúrico concentrado (96 %), AnalytiCals; ácido acético glacial para análisis (99 %), Merck; ácido fórmico (96 %), Aldrich; hidróxido sódico (98 %), Merck.
- Sales: sulfato sódico anhidro (99 %), Merck; carbonato potásico (99 %), Aldrich; cloruro sódico (99.9%), Vorquímica S.L.; tiosulfato sódico (99 %), Panreac; yoduro potásico (99 %), Aldrich; yodato potásico (99 %), Aldrich; bromuro potásico (99 %), Aldrich.
- Reactivos clorantes: Hipoclorito sódico con una concentración de cloro libre de 4 % (p/v), Aldrich.
- Derivatizantes: N-(tert-butildimetilsilil)-N-metiltrifluoroacetamida, MTBSTFA (97 %) Aldrich; bis-(trimetilsilil)trifluoroacetamida, BSTFA (97 %), Aldrich.

1.1.2. Patrones

- Triclosán (5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol) 97 %, Aldrich.
- 2,4-diclorofenol, 2,3-diclorofenol, 2,5-diclorofenol, 2,6-diclorofenol, 3,4-diclorofenol, 3,5-diclorofenol, todos ellos con pureza > 98 %, Merck.
- 2,3,4-triclorofenol, 2,4,6-triclorofenol, 2,3,5-triclorofenol, 2,4,5-triclorofenol, 2,3,6-triclorofenol, todos ellos con pureza del 99 %, Merck.
- Metiltriclosán (5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)anisol) >98 %, Toronto Research Chemicals.
- Metilparaben, Etilparaben, Propilparaben, Butilparaben y Bencilparaben, todos ellos de 99 % de pureza, Fluka.
- 3-clorometilparaben 98 % de APIN Chemicals LTD y 3-cloroetilparaben 97 % de pureza, Aldrich.
- 2,4,6-triclorobifenilo (PCB-30) 98.5 %, Dr Ehrenstorfer.

1.1.3. Adsorbentes para SPE y fibras de SPME

- Adsorbentes de SPE: Cartuchos Oasis HLB® (60 mg), Waters; cartuchos de sílica Sep-Pak®, (500 mg) Waters; Florisil® (60-100 mesh), Aldrich; alúmina neutra (150 mesh), Aldrich; sílica neutra (230-400 mesh), Aldrich; sílica ácida (5, 10 y 20 % ácido sulfúrico, preparada en el laboratorio a partir de sílica neutra); C18 (70-230 mesh), Aldrich; arena lavada con ácido sulfúrico, VWR.
- Fibras de SPME: Polidimetilsiloxano (PDMS) de 100 µm, Polidimetilsiloxano-Divinilbenceno (PDMS-DVB) de 65 µm, Poliacrilato (PA) de 85 µm, Carbowax-Divinilbenceno (CW-DVB) de 70 µm y Carboxen-Polidimetilsiloxano (CAR-PDMS) de 75 µm, Supelco.

1.2. Instrumentación

1.2.1. Material general de laboratorio

- Material de vidrio de uso habitual en el laboratorio
- Balanza electrónica de precisión (Sartorius BP3150)
- Granatario (Sartorius BP310S)
- Placa agitadora-calefactora (Selecta)
- Barras agitadoras magnéticas recubiertas de teflón
- Soporte manual de fibras para SPME (Supelco)
- Viales de vidrio de distintos volúmenes para SPME (10, 20 y 100 mL) con septas de elastómero recubiertas de teflón
- Viales de vidrio para cromatografía de gases de 1.5 mL para muestreador automático
- Pipetas automáticas de 20-200 µL y 100-1000 µL (Kartell, Eppendorf, Transferpette)
- Electrodo de membrana de vidrio para medida de pH (Methrom 654)
- Filtros de fibra de vidrio de 47 mm de diámetro y 1 µm de tamaño de poro (Millipore)
- Filtros de membrana de 47 mm de diámetro y 0.45 µm de éster de celulosa (Millipore)
- Filtros de jeringa de 13 mm de diámetro y 0.22 µm de tamaño de poro (Millex GV)
- Jeringas de 2 mL
- Bomba de vacío, modelo Aspirator A-35 (Eyela)
- Fritas de vidrio
- Tubos y conectores de teflon
- Baño de ultrasonidos (Selecta)
- Estufa (Reyoe)
- Centrífuga (Unicen)
- Tubos de centrifuga de Pyrex

- Embudos de Extracción Líquido-Líquido de 250 mL
- Cartuchos de SPE de polipropileno de 15 mL (IST)
- Fritas de polietileno de 20 mm (IST)
- Botellas de vidrio ámbar de 300 mL
- Mortero de vidrio de 100 mL de capacidad
- Filtros de celulosa para PLE de 20 mm (Ahlstrom)
- Medidor de cloro HI 93710 (Hanna Instruments)
- Equipo de concentración de muestras líquidas, por corriente de nitrógeno, Turbo Vap II Workstation (Zymark Corporation)
- Tamizador con placas de distinta luz de malla (Retsch)
- Liofilizador Cryodos con 8 bocas (Telstar)

1.2.2. Equipos de extracción utilizados

- Sistema de extracción por microondas: extractor Ethos (Milestone) equipado con 12 vasos de teflón.
- Sistema de extracción con disolventes presurizados: ASE 200 (Dionex) equipado con celdas de acero de 11 mL y viales colectores de 60 mL.
- Extractor Soxhlet con capacidad para 125 mL y cartuchos de celulosa para extracción (Supelco).

1.2.3. Programas informáticos

- Paquete estadístico Statgraphics Plus 5.1 y Statgraphics Centurion XV.I
- Saturn GC-MS workstation software (versión 5.4 y 6.42).

1.2.4. Sistemas GC-MS

- Cromatógrafo de gases Varian CP-3900 con puerto de inyección tipo split-splitless acoplado a un espectrómetro de masas de trampa de iones Saturn 2100T, provisto de un autosampler Varian CP8400. Columna: HP5-MS (30 m x 0.25 mm d.i. x 0.25 μ m d_f).
- Cromatógrafo de gases Varian CP-3800 con puerto de inyección tipo split-splitless acoplado a un espectrómetro de masas de trampa de iones Saturn 2200, provisto de autosampler Combi-Pal. Columna: CP-Sil8 (30 m x 0.25 mm d.i. x 0.25 μ m d_f).
- Cromatógrafo de gases Varian GC Star Cx con puerto de inyección tipo split-splitless acoplado a un espectrómetro de masas de trampa de iones Saturn 3. Columna: CP-Sil8 CB Low Bleed/MS (30 m x 0.25 mm d.i. x 0.25 μ m d_f).

1.3. Preparación de patrones

Se prepararon por pesada, en una balanza analítica de precisión, disoluciones *stock* individuales de 2 mg/g en metanol para cada uno de los compuestos objeto de estudio. Posteriormente, a partir de las disoluciones *stock*, se prepararon (también por pesada) disoluciones mezcla de trabajo en metanol (para hacer las adiciones a muestras de agua, lodos, polvo y material biológico) y patrones de calibración en acetato de etilo y en acetonitrilo de distintas concentraciones.

Los patrones se almacenaron en congelador y los *stock* se prepararon aproximadamente cada 12 meses para prevenir posibles problemas derivados de su degradación.

II. METODOLOGÍA DESARROLLADA

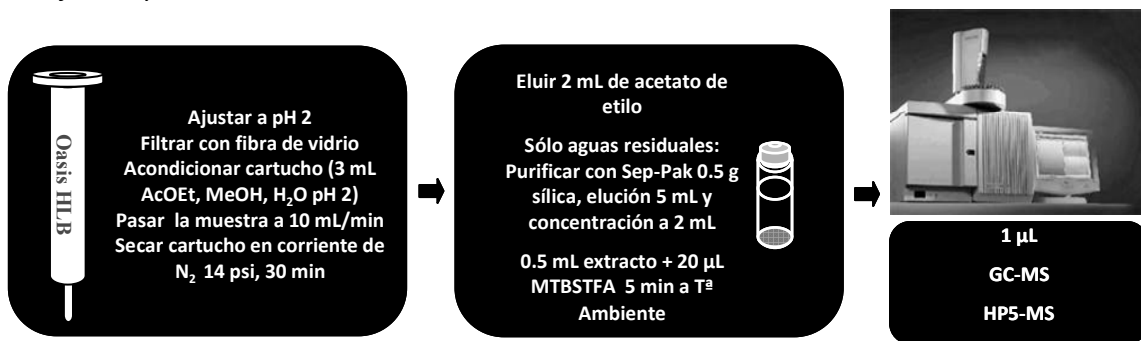
2.1. Protocolos de preparación de muestra

2.1.1. Determinación de triclosán y sus derivados en muestras acuosas mediante extracción en fase sólida

El protocolo desarrollado para concentrar muestras acuosas mediante SPE consta de los siguientes pasos:

1. Acidificación de la muestra a pH 2-3 con ácido clorhídrico 2 M.
2. Filtración con filtros de fibra de vidrio.
3. Acondicionamiento del cartucho Oasis HLB® (60 mg/3 mL) con 3 mL de acetato de etilo, 3 mL de metanol y 3 mL de agua a pH 2.
4. Paso de la muestra a través del cartucho con un flujo aproximado de 10 mL/min.
5. Secado del cartucho con corriente de nitrógeno a 14 psi durante 30 minutos.
6. Elución del cartucho con acetato de etilo, recogiendo 2 mL de eluyente.
7. En el caso de análisis de muestras de agua residual, se procede a la purificación de los extractos primarios con cartuchos de sílica Sep-Pak® de 500 mg (Waters). Se deposita el eluato procedente del cartucho Oasis HLB® en este adsorbente, eluyendo posteriormente una fracción de 5 mL de acetato de etilo, que es concentrada a un volumen final de 2 mL.
8. Una alícuota de 0.5 mL del extracto se derivatiza con 20 µL MTBSTFA a temperatura ambiente durante 5 minutos
9. Los patrones de calibrado se prepararon a partir de las mezclas correspondientes en acetato de etilo, siendo derivatizados del mismo modo que los extractos de las muestras de agua.

Figura II.1. Esquema del proceso de extracción en fase sólida para la determinación triclosán, clorofenoles y metiltriclosán.

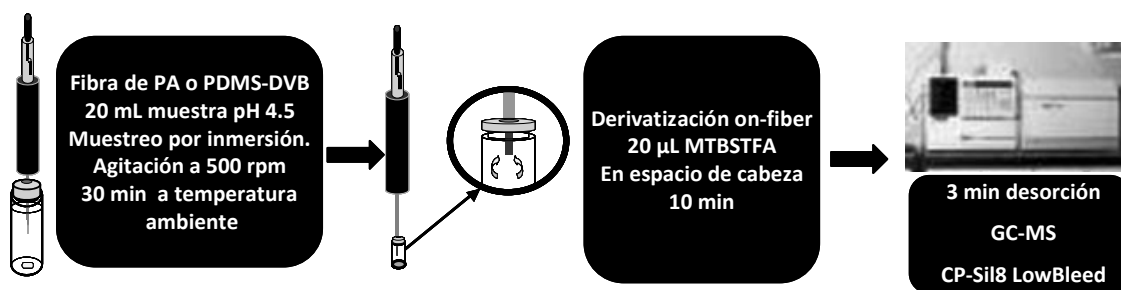


2.1.2. Determinación de triclosán y sus derivados en muestras acuosas mediante microextracción en fase sólida

Para la determinación de triclosán, metiltriclosán y clorofenoles relacionados en agua se ha desarrollado otra metodología analítica basada en la microextracción en fase sólida combinada con una etapa posterior de derivatización *on-fiber*. El protocolo se describe detalladamente a continuación:

1. Acidificación del agua a analizar a pH 4.5 con ácido clorhídrico 0.05 M. En el caso de que contenga materia particulada, se procederá a la filtración previa con filtros de fibra de vidrio.
2. Tomar un volumen de muestra de 20 mL y depositarla en un vial de 22 mL.
3. Adición del patrón correspondiente en metanol para obtener la concentración deseada, manteniendo el porcentaje de metanol en el vial de SPME por debajo de 1 % (v/v). Sellar con cápsula de aluminio y con septa de teflón. Agitar a 500 rpm durante 2 minutos.
4. Introducción de la fibra de PA o PDMS-DVB a través de un orificio practicado en el séptum, exponiéndola directamente a la muestra durante el tiempo seleccionado (30 minutos).
5. Tras el muestreo, retraer la fibra y sacar del vial.
6. Exponer al espacio de cabeza de un vial de 1.5 mL, conteniendo 20 μ L de derivatizante (MTBSTFA) a temperatura ambiente, durante 10 minutos.

Figura II.2. Proceso de microextracción en fase sólida para la determinación de triclosán, clorofenoles y metiltriclosán.

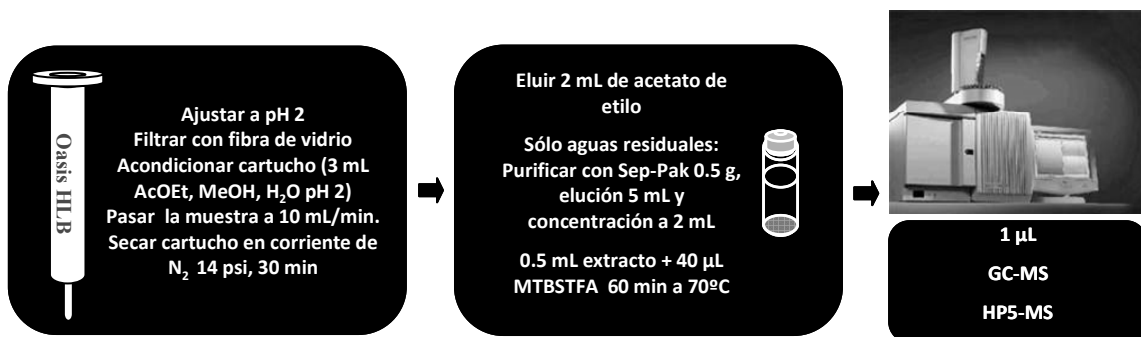


2.1.3. Determinación de derivados del ácido *parahidroxibenzoico* en muestras de agua mediante extracción en fase sólida

El protocolo para la determinación de metilparaben, etilparaben, propilparaben, butilparaben y bencilparaben en agua se detalla a continuación:

1. Acidificación de la muestra acuosa a pH 2-3 con ácido clorhídrico 2 M.
2. Filtración de la misma con filtros de fibra de vidrio.
3. Acondicionamiento del cartucho Oasis HLB® (60 mg/3 mL) con 3 mL de acetato de etilo, 3 mL de metanol y 3 mL de agua a pH 2.
4. Paso de la muestra a través del cartucho con un flujo aproximado de 10 mL/min.
5. Secado del cartucho con corriente de nitrógeno a 14 psi durante 30 minutos.
6. Elución del cartucho con acetato de etilo, recogiendo 2 mL de eluyente.
7. En el caso de análisis de muestras de agua residual, se procede a la limpieza de los extractos con cartuchos de sílice Sep-Pak® de 500 mg, Waters. Para ello, se deposita el eluato obtenido anteriormente en este segundo cartucho, y se eluye una fracción de 5 mL con acetato de etilo, que posteriormente se concentrará a un volumen final de 2 mL.
8. Se toman 0.5 mL de ese extracto y se le añade 40 µL del agente derivatizante (MTBSTFA). Se agita y se deja reaccionar a 70°C durante 1 hora.
9. Los patrones de calibrado se prepararon a partir de las mezclas correspondientes en acetato de etilo, siendo derivatizados del mismo modo que las muestras.

Figura II.3. Esquema del proceso de extracción en fase sólida para la determinación de parabenos en muestras acuosas.

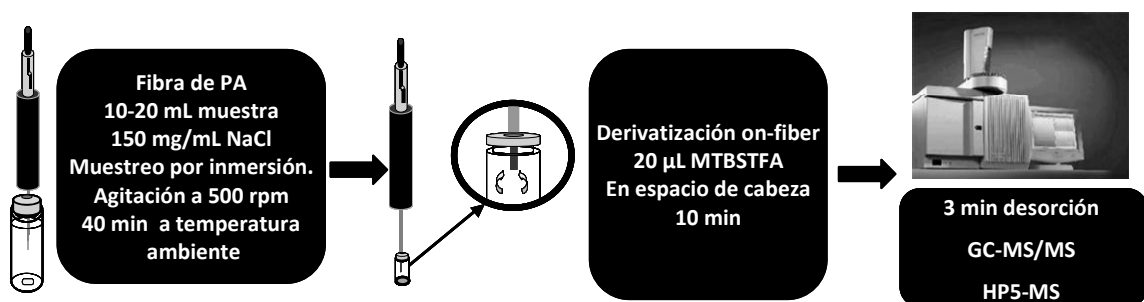


2.1.4. Determinación de metilparaben, etilparaben, propilparaben, butilparaben y bencilparaben en muestras acuosas mediante microextracción en fase sólida

Para la determinación de parabenes en muestras acuosas, se ha desarrollado también una metodología basada en la microextracción en fase sólida con derivatización en la fibra de los compuestos estudiados:

1. Verificar que el pH de la muestra se encuentra en torno a 6-7 unidades. En el caso de que contenga materia particulada, se procederá a la filtración con filtros de fibra de vidrio.
2. Tomar un volumen de muestra de 10 mL y adicionar 150 mg/mL de NaCl, depositándolos en un vial sellado de 11 mL.
3. Adición del patrón correspondiente en metanol para obtener la concentración deseada, manteniendo el porcentaje de metanol por debajo del 1 % (v/v) en el vial de extracción. Sellar con cápsula de aluminio y con septa de teflón. Agitar a 500 rpm durante 2 minutos.
4. Introducción de la fibra de PA a través de un orificio practicado en el séptum, exponiéndola directamente a la muestra durante el tiempo seleccionado (40 minutos).
5. Tras el muestreo, retraer la fibra y retirar el vial.
6. Exponer la fibra al espacio de cabeza de un vial de vidrio de 1.5 mL, conteniendo 20 μ L de derivatizante (MTSBTFA), a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Figura II.4. Proceso de microextracción en fase sólida para la determinación de parabenes.

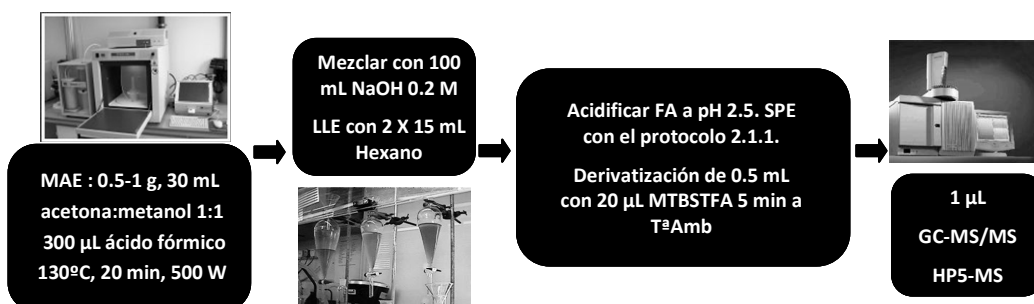


2.1.5. Determinación de triclosán y clorofenoles relacionados en muestras de sedimentos y lodos de depuradora mediante extracción asistida por microondas

La metodología desarrollada para el análisis de muestras de lodo de depuradora y sedimentos se basa en la extracción asistida por microondas. El proceso comienza con la liofilización de las muestras, seguido de la homogeneización de las mismas con un triturador. El protocolo se describe a continuación:

1. Se deposita 1 g de sedimento, ó 0.5 g de lodo liofilizados, en un vaso de microondas de teflón con 30 mL de acetona:metanol (1:1) y 300 μ L de ácido fórmico.
2. Proceder a la extracción en el microondas a 130 $^{\circ}$ C durante 20 minutos con una potencia de 500 Watios.
3. Centrifugar el extracto a 3500 rpm, recoger el sobrenadante y mezclarlo con 100 mL de NaOH 0.2 M (pH 12.7).
4. Extracción líquido-líquido con 2 x 15 mL de n-hexano.
5. Recuperar la fase acuosa y ajustar a pH 2.5 con HCl 2 M.
6. Realizar la SPE de esa fase acuosa tal como se ha descrito en la sección 2.1.1., realizando un lavado, previo al secado de los cartucho Oasis HLB[®] 60 mg, con 25 mL de una disolución acuosa al 20 % de metanol. Los extractos se purificaron también con cartuchos de sílica Sep-Pak[®] de 500 mg.
7. Derivatización de 0.5 mL de extracto con 20 μ L de MTBSTFA durante 5 minutos a temperatura ambiente.
8. Inyección de 1 μ L de extracto en el cromatógrafo de gases, con determinación mediante MS/MS.

Figura II.5. Esquema de preparación de las muestras de sedimentos y lodos de depuradora para el aislamiento de triclosán y clorofenoles relacionados.

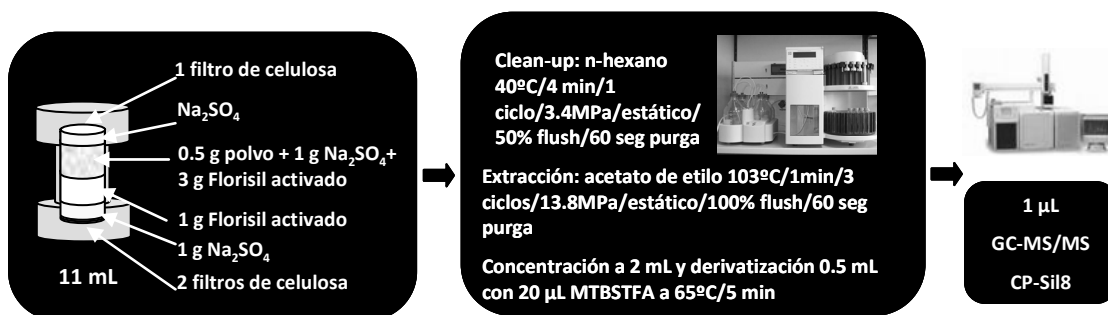


2.1.6. Extracción conjunta de triclosán, metil-, etil-, propil- y butilparaben en muestras de polvo usando extracción con disolventes presurizados

Dentro del análisis de muestras de polvo de ambientes interiores, se ha desarrollado una metodología de extracción con disolventes presurizados para los compuestos anteriores. Las muestras, recogidas de aspiradores domésticos, fueron tamizadas considerando la fracción con tamaño de partícula por debajo de 60 μm para su análisis, almacenándolas a temperatura ambiente en recipientes estériles. La preparación de la muestra se lleva a cabo del siguiente modo:

1. Se prepara la celda de 11 mL de acero, introduciendo de abajo a arriba: 2 filtros de celulosa de 20 mm de diámetro, 1 g de sulfato sódico anhidro, 1 g de Florisil activado (130°C/48 h), la muestra dispersada con 3 g de Florisil activado y 1 g de sulfato sódico anhidro. Rellenar la celda con sulfato sódico anhidro y colocar un filtro de celulosa.
2. Se procede a una limpieza previa de la muestra con n-hexano a 40°C en un ciclo estático de 4 minutos a 3.4 MPa. El *flush* se programa a 50 % y la purga de la celda se fija en 1 minuto.
3. La extracción de la muestra se realiza con acetato de etilo a 103°C, en 3 ciclos de 1 minuto a 13.8 MPa en estático. El volumen de *flush* se fija en 100 % y el tiempo de purga en 60 segundos.
4. Concentrar el extracto de acetato de etilo a 2 mL y filtrar con filtros de 0.22 μm .
5. Derivatizar 0.5 mL con 20 μL de MTBSTFA, a 65°C, durante 5 minutos e inyectar en el cromatógrafo 1 μL .

Figura II.6. Protocolo de preparación de muestras de polvo mediante extracción acelerada con disolventes.

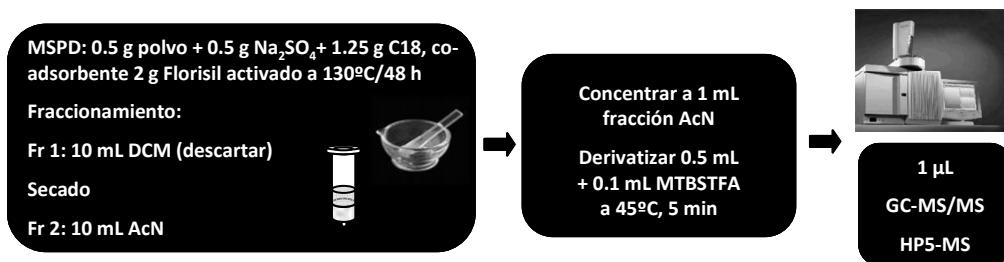


2.1.7. Extracción conjunta de triclosán, metil-, etil-, propil- y butilparaben en muestras de polvo mediante dispersión de la matriz en fase sólida

El tipo de muestras empleado en este estudio y la fracción analizada fueron las mismas que en el caso anterior. El protocolo optimizado de preparación de muestra se detalla a continuación:

1. Pesar 0.5 g de polvo y 0.5 g de sulfato sódico anhidro y depositarlos en un mortero de vidrio.
2. Pesar 1.25 g de C18, añadirlos al mortero y realizar la dispersión de la muestra hasta la obtención de un polvo muy fino.
3. En el cartucho de 15 mL de polipropileno, conteniendo una frita de polietileno, se depositan 2 g de Florisil activado a 130° durante 48 horas.
4. Se añade el dispersado del mortero y para compactar el contenido, se introduce otra frita.
5. Se hace un lavado del cartucho con 10 mL de diclorometano, descartándolo.
6. Se seca el cartucho a vacío.
7. Elución con 10 mL de acetonitrilo y concentración del extracto a 1 mL. Filtrar con filtros de 0.22 µm.
8. Derivatización de 0.5 mL con 0.1 mL de MTBSTFA a 45°C durante 5 minutos.
9. Inyección de 1 µL en GC-MS/MS.

Figura II.7. Esquema del procedimiento para la extracción de parabenos y triclosán mediante MSPD.

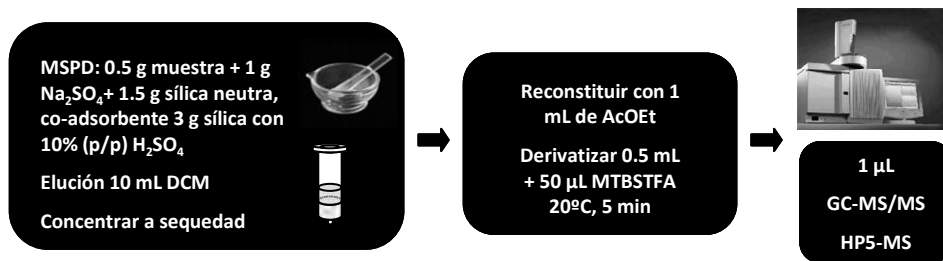


2.1.8. Determinación de triclosán y metiltriclosán en material biológico mediante MSPD

Se ha optimizado también un método para la extracción de triclosán y metiltriclosán en muestras de pescado y alimentos. En el caso del pescado, se eliminan espinas, piel y agallas. El músculo se liofiliza hasta obtener una muestra completamente seca y homogénea. Las muestras de alimento, se utilizaron tal como se adquieren en el supermercado. El protocolo de preparación de muestra se describe a continuación:

1. Se dispersan 0.5 g de muestra con 1 g de sulfato sódico anhidro y 1.5 g de sílica neutra activada.
2. En el cartucho de polipropileno de 15 mL se depositan, después de la frita de polietileno, 3 g de sílica impregnada con un 10 % (p/p) de ácido sulfúrico.
3. Se recogen 10 mL de diclorometano y se concentran a sequedad
4. Reconstituir el residuo con 1 mL de acetato de etilo y filtrar con filtros de jeringa de 0.22 μm .
5. Se derivatizan 0.5 mL de extracto con 50 μL de MTBSTFA durante 5 minutos a temperatura ambiente.
6. Se inyecta un microlitro en el sistema GC-MS/MS.

Figura II.8. Protocolo para la extracción de triclosán y metiltriclosán en muestras biológicas.



2.2. Condiciones de determinación

Los métodos de determinación propuestos utilizan la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, tanto simple (GC-MS) como en tándem (GC-MS/MS), como técnicas de determinación. En el primer caso, es posible identificar las especies presentes en el cromatograma por sus espectros de masas, considerando la fragmentación existente y comparando con la biblioteca de espectros. En el segundo caso, tal como ya ha sido mencionado anteriormente, es posible incrementar la relación señal-ruido, así como obtener mayor selectividad. Por esta razón, la espectrometría de masas se ha seleccionado como técnica de detección en muestras de agua, especialmente en los estudios de degradación de los analitos en agua clorada, para la identificación de los subproductos generados. En cambio, en el caso de las muestras sólidas, se ha seleccionado MS/MS para aumentar la selectividad y reducir los límites de cuantificación alcanzados.

2.2.1. GC-MS

En las siguientes tablas se muestran los parámetros cromatográficos, así como los relativos al espectrómetro de masas, para la determinación de los analitos de interés.

Tabla II.1. Parámetros de determinación de triclosán, metiltriclosán, clorofenoles y parabenos mediante GC-MS.

Parámetros cromatográficos		
	SPME (TCS)	Iny. Directa (TCS y Parabenos)
<i>Columna cromatográfica</i>	CP-Sil8 Low Bleed	HP5-MS
<i>Inyector</i>	Split/splitless	Split/splitless
<i>Modo Inyección</i>	Splitless	Splitless
<i>Tª inyector</i>	PA : 270°C PDMS-DVB : 260°C	280 °C (1 µL)
<i>Tiempo splitless</i>	3 min	2 min
<i>Flujo split</i>	20 mL/min	20 mL/min
<i>Tª inicial</i>	70°C (3 min)	50°C (2 min)
<i>Rampa</i>	10°C/min	10°C/min
<i>Tª final</i>	270 °C (10 min)	270 °C (10 min)
<i>Flujo gas portador (He)</i>	1 mL/min	1 mL/min

Parámetros MS	
<i>Modo de ionización</i>	EI (70 eV)
<i>Corriente de emisión del filamento</i>	20 μ A
<i>Voltaje del multiplicador</i>	2000 V
<i>Rango masas</i>	100-550 m/z
<i>Tª manifold</i>	50°C
<i>Tª línea de transferencia</i>	280°C
<i>Tª trampa de iones</i>	220°C
<i>Tiempo de delay</i>	10 min

2.2.2. GC-MS/MS

Las siguientes tablas se muestran las condiciones de determinación en GC-MS/MS. Para el desarrollo del método de MS/MS una vez seleccionado el ión precursor, la ventana de aislamiento y el *offset* del multiplicador, se ha de optimizar el nivel de almacenamiento (*Storage Level*) y la amplitud de excitación. La elección del ión precursor o padre se hace en base a los espectros de masas de impacto electrónico obtenidos realizando un barrido completo (*full scan*). La ventana de aislamiento (*Isolation Window*) permite aislar en la trampa un rango próximo al ión precursor. Los valores recomendados oscilan entre 1 y 14 unidades de m/z, aunque lo más habitual es la utilización de 3 unidades de m/z, lo que implica que toma un segmento de 1.5 unidades inferior y superior a la relación m/z del ión padre. El *offset* del multiplicador permite mejorar los límites de detección incrementando el voltaje del detector. En general, se observa una ganancia de 10^5 cuando tenemos un *offset* de 300 V.

Una vez fijados los parámetros anteriores, con ayuda de la herramienta de desarrollo automatizado de métodos (AMD) que posee el software empleado, se han optimizado el nivel de almacenamiento y la amplitud de excitación.

El nivel de almacenamiento depende de la masa del ión precursor. Para su cálculo, se utiliza la herramienta "q" que posee el software. Este parámetro depende de la relación m/z del ión padre o precursor y nos indica la masa más baja que va a ser almacenada en la trampa una vez fragmentado éste, teniendo en cuenta que debe fijarse al menos dos unidades por debajo del ión producto con menor relación m/z.

Para la optimización de la amplitud de excitación se hace un barrido variando, hasta un máximo de 10 valores, el voltaje aplicado al ión precursor. Este dependerá del tipo de onda que

seleccionemos, siendo no-resonante en el caso de iones de naturaleza lábil, frente al modo resonante para aquellos más difíciles de fragmentar, ya que a mayor voltaje, menor es la energía de la onda de radiofrecuencias necesaria para re-fragmentar el ión precursor.

Tabla II.2. Parámetros de GC-MS/MS para la determinación de triclosán, metiltriclosán, clorofenoles y parabenos.

Parámetros cromatográficos		
	SPME (Parabenos)	Iny. Directa (Parabenos y TCS)
<i>Columna cromatográfica</i>	HP5-MS	HP5-MS/CP-Sil8
<i>Inyector</i>	Split/splitless	Split/splitless
<i>Modo Inyección</i>	Splitless	Splitless
<i>Tª inyector</i>	PA: 270 °C	280 °C (1 µL)
<i>Tiempo splitless</i>	3 min	2 min
<i>Flujo split</i>	20 mL/min	20 mL/min
<i>Tª inicial</i>	70°C (3 min)	50°C (2 min)
<i>Rampa</i>	10°C/min	10°C/min
<i>Tª final</i>	270 °C (10 min)	270 °C (10 min)
<i>Flujo gas portador (He)</i>	1 mL/min	1 mL/min
Parámetros MS/MS		
<i>Modo de ionización</i>	EI (70 eV)	
<i>Corriente de emisión del filamento</i>	70 µA	
<i>Voltaje del multiplicador</i>	2000 V (offset +100 V)	
<i>Tª manifold</i>	50°C	
<i>Tª línea de transferencia</i>	280°C	
<i>Tª trampa iones</i>	220°C	
<i>Tiempo de delay</i>	10 min	
<i>Modo de preparación</i>	CID, resonante	
<i>Ventana aislamiento</i>	± 3 m/z	

Adquisición MS/MS					
Compuesto	Ión precursor (m/z)	Nivel de almacenamiento (m/z)	Amplitud de excitación (V)	Rango de adquisición (m/z)	Iones de cuantificación (m/z)
<i>2,4-DCF</i>	219	96	0.53	90-230	183
<i>2,4,6-TCF</i>	255	110	1.10	100-270	217
<i>2,3,4-TCF</i>	255	110	1.10	100-270	217
<i>MTCS</i>	304	130	1.50	120-330	232+252+254
<i>TCS</i>	347	140	1.50	130-360	200+310
<i>MeP</i>	209	92	0.5	85-220	177
<i>EtP</i>	223	98	0.5	90-240	151+177+195
<i>PrP</i>	237	104	0.5	90-250	151+195
<i>BuP</i>	251	110	0.5	100-260	151+195
<i>BzP</i>	285	90	0.4	80-300	163+241



CAPÍTULO III

I. DETERMINACIÓN DE TRICLOSÁN Y SUS DERIVADOS EN AGUA MEDIANTE MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

1.1. Introducción

La extracción líquido-líquido y en fase sólida son las modalidades más comunes para la determinación de contaminantes emergentes en muestras líquidas. En general, son técnicas que precisan grandes volúmenes de muestra, disolventes muchas veces tóxicos y etapas posteriores de concentración y limpieza [Sabaliunas D; 2003][Singer H; 2002][Boyd GR; 2003][Lindstrom A; 2002].

La microextracción en fase sólida (SPME) ha sido seleccionada para la extracción conjunta de triclosán, metiltriclosán, 2,4-diclorofenol y 2,3,4-triclorofenol en muestras acuosas como alternativa a otras técnicas de concentración. De este modo, se reduce el volumen de muestra, la manipulación de la misma y el uso de disolventes orgánicos. Combinada con la cromatografía de gases, permite obtener límites de cuantificación muy bajos, ya que los analitos son desorbidos directamente en el inyector del cromatógrafo a alta temperatura. El problema lo encontramos cuando tenemos grupos polares en las moléculas de las especies a determinar, como es el caso del triclosán y los clorofenoles, puesto que será necesario la derivatización de los mismos para incrementar la eficacia de las separaciones cromatográficas así como reducir los límites de cuantificación del método analítico. La derivatización en SPME, tal como se indicó en la introducción, puede llevarse a cabo en la propia matriz o sobre la fibra. En el primer caso, lo más habitual es añadir a la muestra el agente derivatizante, por ejemplo el anhídrido acético [Llompert M; 2002], mientras que en el segundo, el derivatizante se deposita, previa o posteriormente a la extracción de los analitos, sobre la fase polimérica de la fibra de SPME [Rodríguez I; 2004].

Dentro de las aplicaciones desarrolladas para la determinación de triclosán en muestras acuosas, solamente hay una referencia relativa a la utilización de la SPME. Lores y colaboradores [Lores M; 2005][Sánchez-Prado L; 2006 A y B] utilizaron la fibra de polidimetilsiloxano (PDMS) para estudiar la degradación fotoquímica del triclosán e identificar los productos generados. La elección del recubrimiento de PDMS se hace en base a la estructura del polímero, sin considerar su eficacia en la extracción de los compuestos, puesto que este no presenta dobles enlaces que puedan absorber la radiación utilizada para irradiar los compuestos adsorbidos.

Con respecto al metiltriclosán, no se ha encontrado ninguna aplicación en la que se utilice la microextracción en fase sólida como técnica de extracción.

En el caso de los clorofenoles, la SPME ha sido ampliamente utilizada para su determinación en matrices acuosas. En la tabla I.1, se resumen las aplicaciones más relevantes.

Tabla 1.1. Aplicaciones de SPME para la determinación de clorofenoles en muestras acuosas.

Analitos y matriz	Procedimiento	Detec.	LOD (ng/L)	RSD (%)	Ref.
30 fenoles en agua (2,4-DCF, 2,4,6-TCF, 2,3,4-TCF)	Derivatización: anhídrido acético 4 µL/mL y 0.02 g KHCO ₃ SPME 1: HS-SPME con CAR-PDMS, 12 mL muestra con 0.6 g/mL NaCl, 30 min a 100°C SPME 2: HS-SPME con PDMS, 12 mL muestra con 0.6 g/mL NaCl, 30 min a 60°C.	GC-MS	3-13	0.3-7.7	(1)
13 clorofenoles (2,4-DCF, 2,3,4-TCF, 2,4,6-TCF) en lixiviados de suelos	SPME directa con PA, 2 mL muestra a pH 2, saturada con NaCl, 60 min a 40°C con agitación a 500 rpm.	GC-MS	5-25	4.5-5.2	(2)
Pesticidas ácidos, entre ellos 2,4-DCF, en agua	Derivatización: 1.2 mL muestra + 50 µL de piridina (204 mg/L), fenantreno-d ₁₀ (0.1 mg/L) y 2,4-D-d ₃ (0.5 mg/L) + 300 mg NaCl, mezclar 30 min. Añadir 5 µL butilcloroformiato. Dejar 24 h reaccionando. SPME: PDMS 20 min HS-SPME.	GC-MS	160	4.6-8.3	(3)
10 fenoles (2,4-DCF, 2,4,6-TCF) en agua	SPME directa con PA, 20 mL muestra, 10 % NaCl, pH 4, agitación 1000 rpm, 40 min a 35°C.	GC-MS	53-60	6.3-11	(4)
Varios clorofenoles (2,4-DCF, 2,4,6-TCF) en agua	HS-SPME con PA, 7.5 mL muestra, 50 mM HCl, 0.2 M KCl, 30 min a 80°C.	GC-FID	40-60	3.6-4.7	(5)
Varios fenoles (2,4-DCF) en agua	SPME directa con PA, 5 mL muestra, 15 % NaCl, 40 min a 70°C.	GC-FID	350	1.2	(6)
Varios clorofenoles (2,4-DCF, 2,4,6-TCF) en agua	Derivatización: Exposición de la fibra PDMS-DVB al HS del vial con 1.5 mL cloruro de pentafluorobencilo 0.1 % (v/v) en tolueno, 20 min a 40°C Extracción: SPME directa con 3 mL muestra, 2 % (p/v) K ₂ CO ₃ , agitación, 10 min a 40°C. SPME: SPME directa con Carbowax/TPR-100, 4 mL	GC-ECD	10-5	6.4-10.3	(7)
8 clorofenoles (2,4-DCF, 2,4,6-TCF) en agua	muestra, 30% NaCl, pH 2.7, agitación 550 rpm, 40 min a 40°C. Desorción : introducir fibra en 60 µL de 5 % polioxietileno 10 lauril éter 10 min.	HPLC-DAD	1100-2200	7.5-11.5	(8)

(1) Llompert M, 2002; (2) Ribeiro A, 2002; (3) Henriksen T, 2001; (4) Guerra Simões N, 2007; (5) Portillo M, 2006; (6) Lanças FM, 2007; (7) Bianchi F, 2002; (8) Mahugo Santana C, 2007.

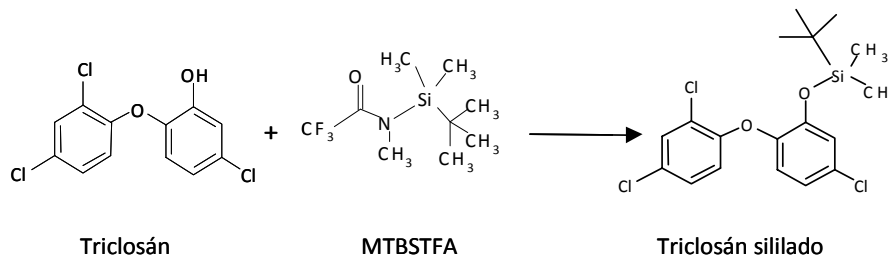
1.2. Experimentos previos

1.2.1. Identificación cromatográfica

La identificación de los analitos, en el método de SPME, se llevó a cabo utilizando el tiempo de retención de los picos registrados, así como los espectros de masas obtenidos en *full scan* para los

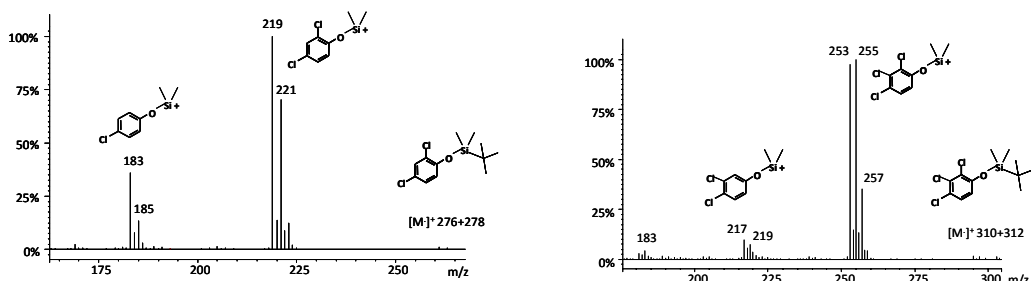
compuestos derivatizados. Los clorofenoles y el triclosán presentan en su estructura un grupo hidroxilo el cual es susceptible de sufrir una reacción con el agente sililante dando lugar a un éter de silicio con 114 unidades de masa sobre el peso molecular del analito de partida, figura I.1.

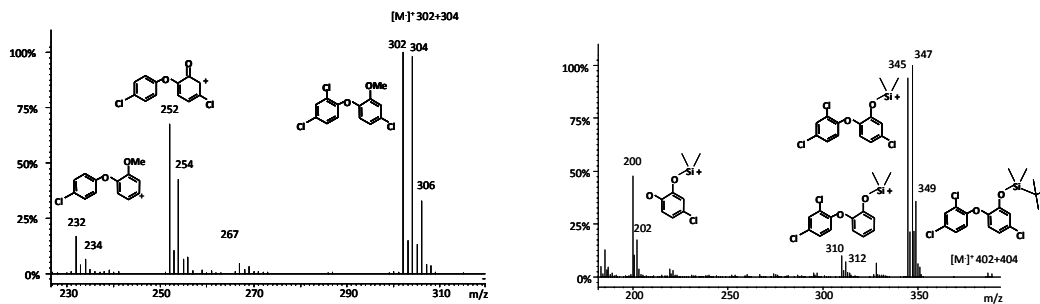
Figura I.1. Reacción entre el triclosán y el MTBSTFA.



El compuesto tert-butildimetilsililado, al entrar en contacto con la fuente de ionización, da lugar a un fragmento característico de m/z $[M-57]^+$, correspondiente a la pérdida del grupo tert-butilo. Debido a la presencia de átomos de cloro en las moléculas de los analitos, se obtuvo el patrón de fragmentación derivado de la abundancia isotópica de este elemento. Para el cloro elemental existen dos isótopos en la naturaleza: el ^{35}Cl y el ^{37}Cl , con abundancias relativas de 75.77 % y 24.23 %, respectivamente. Dado que estamos considerando compuestos diclorados (2,4-DCF) y triclorados (2,3,4-TCF, TCS y MTCS), los iones de fragmentación $[M-57]^+$ y $[M+2-57]^+$ presentarán abundancias relativas 3:2 para el caso de compuestos diclorados y 1:1 para los triclorados. En la figura I.2 se pueden observar los espectros de masas de los analitos considerados.

Figura I.2. Espectros de masas para el 2,4-DCF, 2,3,4-TCF y TCS derivatizados, y el MTCS.





En base a estos primeros experimentos, se establecieron los parámetros de identificación de los analitos, utilizando como técnica de detección GC-MS, tabla I.2.

Tabla I.2. Parámetros de identificación en GC-MS para triclosán y compuestos relacionados.

	Tr (min) ¹	Iones cuantificación (m/z)	Iones identificación (m/z)	Intensidades relativas (%)
2,4-DCF	17.01	219+221	219	100
			221	73
			183	24
2,3,4-TCF	19.51	253+255	253	90
			255	100
			257	37
			217	10
MTCS	22.64	302+304	302	93
			304	100
			252	41
			232	11
TCS	24.73	345+347	345	95
			347	100
			349	36
			310	7
			200	28

¹ Columna tipo CP-Sil 8 Low Bleed

1.2.2. Evaluación de la viabilidad del muestreo mediante SPME con derivatización *on-fiber*

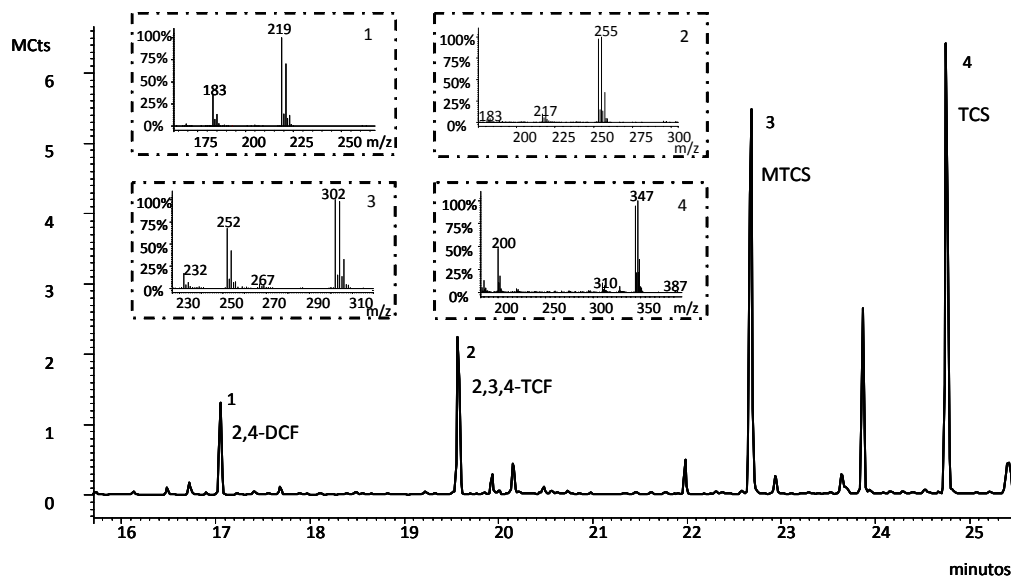
Inicialmente, se evaluó la posibilidad de realizar la extracción mediante SPME y la posterior derivatización *on-fiber* con MTBSTFA. Para ello, en un vial de 22 mL, se depositaron 20 mL de agua ultrapura con adición de un patrón en metanol que contiene triclosán, metiltriclosán, 2,4-diclorofenol y 2,3,4-triclorofenol, de modo que la concentración aproximada fue de 5 ng/mL en la muestra. Se realizó el muestreo por inmersión con agitación a 500 rpm, con un agitador magnético recubierto de teflón, durante 15 minutos. Para las pruebas preliminares, se seleccionó la fibra de poliacrilato (PA) debido a que su naturaleza polar hace que sea adecuada para la extracción de fenoles por inmersión [Ribeiro A; 2002]. Tras el muestreo, la fibra se expuso al espacio de cabeza de un vial de 1.5 mL conteniendo 50 μ L de MTBSTFA durante 20 minutos a 40 $^{\circ}$ C, utilizando las condiciones de derivatización descritas previamente por Rodríguez y colaboradores para anti-inflamatorios con grupos carboxílicos [Rodríguez I; 2004]. Tras ese tiempo, la fibra se desorbió en el puerto de inyección del sistema GC-MS. Los experimentos, llevados a cabo por cuadruplicado, mostraron una variabilidad en la señal para los compuestos derivatizados inferior al 7 %, tabla I.3. Por otra parte, se evaluó si durante este proceso el metiltriclosán sufría algún tipo de degradación. La conclusión fue que su respuesta no se modificaba por la presencia del derivatizante.

Tabla I.3. Repetibilidad de extracción (N=4) y derivatización *on-fiber* para 2,4-DCF, 2,3,4-TCF, MTCS y TCS.

Compuesto	RSD (%)
2,4-DCF	1.8
2,3,4-TCF	5.0
MTCS	4.2
TCS	6.2

En los cromatogramas de GC-MS se han encontrado señales intensas que corresponden a especies tert-butildimetilsililadas, figura I.3. Por otra parte, no hubo presencia de los compuestos sin sililar, lo que implica que el proceso de derivatización en la fibra es cuantitativo.

Figura 1.3. Cromatograma de GC-MS para una muestra de agua (5 ng/mL) extraída con SPME y derivatización *on-fiber*.



1.3. Optimización del proceso de SPME con derivatización *on-fiber*

Una vez demostrada la viabilidad del proceso de derivatización *on-fiber* de los compuestos objeto de estudio, se ha llevado a cabo la optimización sistemática de las distintas variables que pueden afectar a la eficacia del proceso de preparación de muestra con objeto de maximizar su rendimiento.

En primer lugar, se estudiaron los factores que pueden afectar a la eficacia de extracción, manteniendo las condiciones de derivatización usadas en las pruebas preliminares (exposición de la fibra al espacio de cabeza de un vial conteniendo 50 μ L de MTBSTFA durante 20 minutos a 40°C). Para estos experimentos, el nivel de adición de 2,4-DCF, 2,3,4-TCF, TCS y MTCS a las muestras de agua se fijó en 10 ng/mL, y el tiempo de muestreo, salvo que se indique lo contrario, fue de 30 minutos.

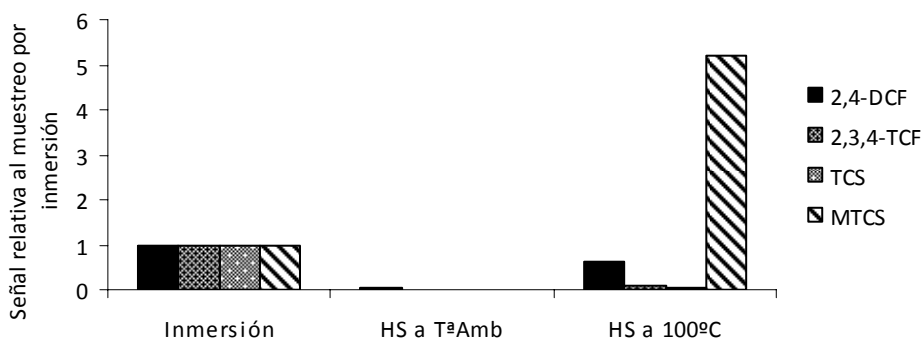
1.3.1. Modo de muestreo

La posición de la fibra es uno de los parámetros más importantes a la hora de optimizar un método de SPME. Los modos de muestreo evaluados han sido:

- Muestreo por inmersión (directo) a temperatura ambiente
- Muestreo en espacio de cabeza (HS) a temperatura ambiente
- Muestreo en HS a 100°C.

Para identificar el modo de muestreo que permite obtener las mayores eficacias de extracción, se llevaron a cabo una serie de experimentos exponiendo la fibra de poliacrilato durante 30 minutos a 15 mL de agua ultrapura ajustada a pH 2 con HCl 0.1 M, en viales de 22 mL. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente figura, figura I.4.

Figura I.4. Señal relativa para los diferentes modos de muestreo considerados frente al muestreo por inmersión.



En el gráfico anterior se puede observar que, con la excepción del metiltriclosán que presenta una respuesta elevada para el muestreo en espacio de cabeza a 100°C, la mejor opción es efectuar el muestreo por inmersión, a temperatura ambiente. Puesto que el objetivo del trabajo es la determinación conjunta de los cuatro compuestos, se seleccionó el muestreo por inmersión para proseguir el estudio.

1.3.2. Comparativa de distintas fases

La selección de la fase extractante es un parámetro importante a la hora de desarrollar un método de SPME, ya que la eficacia de extracción se ve claramente afectada por la naturaleza del recubrimiento de la fibra.

La elección previa de la fibra de poliacrilato (PA) se ha hecho en base a las propiedades polares que presenta este polímero, que lo hacen adecuado para la extracción de clorofenoles, aunque las características del triclosán y, especialmente, del metiltriclosán, menos polares que los

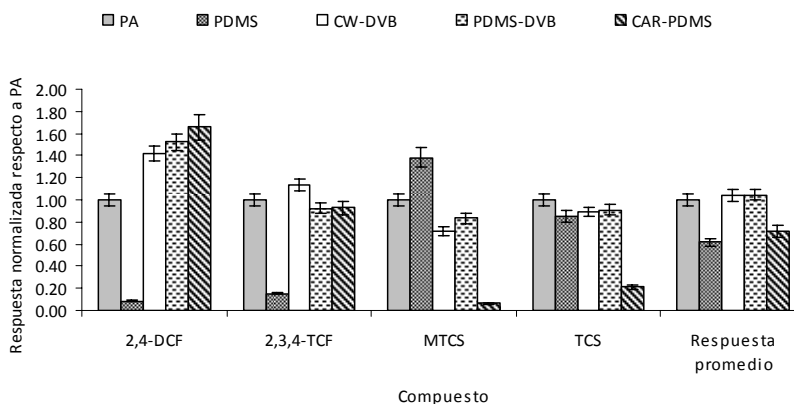
clorofenoles, sugieren la posibilidad de utilizar otras fases. Las fibras estudiadas, así como las temperaturas y el tiempo de desorción empleados se muestran en la siguiente tabla, tabla I.4.

Tabla I.4. Fibras utilizadas.

Fase est.	Espesor (μm)	T ^a operación	T ^a desorción	Tiempo desorción
PDMS	100	200-270°C	260°C	3 min
PDMS-DVB	65	200-270°C	260°C	3 min
PA	85	200-310°C	270°C	3 min
CAR-PDMS	75	240-300°C	270°C	3 min
CW-DVB	65	220-250°C	220°C	3 min

Los experimentos se llevaron a cabo exponiendo las fibras directamente a 20 mL de agua ultrapura, con adición de los compuestos (10 ng/mL), durante 30 minutos. Los resultados obtenidos, figura I.5, muestran que las fibras de PA, CW-DVB y PDMS-DVB, con características polares y semipolares, son las que presentaron mejores resultados para la extracción conjunta de los compuestos.

Figura I.5. Respuestas normalizadas con respecto a la fibra de PA para las distintas fases evaluadas (N=3).



Por otra parte, la fibra de PDMS también proporcionó buenos resultados para el triclosán y, sobre todo, para el metiltriclosán, pero, en cambio, el rendimiento de la extracción fue muy bajo para los clorofenoles, observando un comportamiento inverso en el caso de la fibra de CAR-PDMS. El

triclosán y el metiltriclosán presentan constantes de partición octanol-agua elevadas (4.8 y 5.4) frente a los clorofenoles (2.99 y 3.66), de modo que la utilización de fases de características apolares, como es el caso de PDMS, favorece la extracción de aquellos compuestos más lipofílicos. Por otra parte, la fibra de CAR-PDMS posee una naturaleza bipolar debido a la combinación de ambos polímeros. Esta fibra presenta mayor afinidad por los compuestos de menor tamaño (2,4-DCF y 2,3,4-TCF), ya que la relación entre el tamaño molecular de los analitos y el tamaño de poro del carboxen influye enormemente en la capacidad de adsorción de este polímero. Las fases poliméricas de naturaleza polar, PA y CW-DVB, y la fibra de PDMS-DVB (semipolar), resultaron adecuadas para la extracción conjunta de los cuatro analitos. Finalmente, se seleccionaron las fibras de PDMS-DVB y PA para continuar el estudio, descartando la fibra de CW-DVB, debido a que varios autores han descrito problemas de estabilidad para este recubrimiento, además de que no aporta ventajas adicionales respecto a poliacrilato y PDMS-DVB [Alzaga R; 2003][Rodríguez I; 2003].

1.3.3. Optimización de las condiciones de muestreo con poliacrilato y PDMS-DVB: Influencia de la agitación, fuerza iónica del medio y pH

Utilizando el programa estadístico Statgraphics 5.1, se evaluó la influencia de estas tres variables en la eficacia de la SPME mediante un diseño factorial 2^3 , con 2 puntos centrales. Los valores de estas variables en los distintos experimentos fueron los indicados en la tabla I.5. Como se puede comprobar, en todos los casos, el pH se mantiene por debajo del pK_a de los compuestos. Los experimentos descritos en la tabla I.5 se llevaron a cabo con ambas fibras, empleando muestras de agua ultrapura (15 mL) con adición de los compuestos a 10 ng/mL. Los resultados obtenidos para cada uno de los analitos según la fase utilizada, se muestran en la tabla I.5.

Tabla I.5. Experimentos realizados para evaluar las condiciones óptimas de extracción para las fibras de PA y PDMS-DVB. Respuestas obtenidas en áreas de pico.

Exp.	NaCl (g)	Agitación (500rpm)	pH	PA (Área de pico x 10^4)				PDMS-DVB (Área de pico x 10^4)			
				DCF	TCF	MTCS	TCS	DCF	TCF	MTCS	TCS
1	2.0	Sin	4.5	18	26	60	29	50	46	233	77
2	0.0	Sin	6.0	102	160	182	119	89	109	237	88
3	0.0	Sin	3.0	64	98	273	67	128	158	252	118
4	4.0	Sin	3.0	90	130	99	84	68	92	184	124
5	0.0	Con	6.0	334	960	1900	492	691	992	2234	913
6	2.0	Con	4.5	88	139	904	529	255	126	1075	730

Exp.	NaCl (g)	Agitación (500rpm)	pH	PA (Área de pico x 10 ⁴)				PDMS-DVB (Área de pico x 10 ⁴)			
				DCF	TCF	MTCS	TCS	DCF	TCF	MTCS	TCS
7	4.0	Con	6.0	83	126	467	95	307	184	464	610
8	0.0	Con	3.0	299	763	1248	586	749	1065	2630	1026
9	4.0	Sin	6.0	120	189	51	170	105	106	226	148
10	4.0	Sin	3.0	522	865	226	529	856	1141	580	628

Tras el tratamiento de los datos, con el paquete estadístico Statgraphics 5.1, se obtuvieron los coeficientes estandarizados para los efectos principales asociados con los factores considerados, tabla I.6. Estos coeficientes estiman el efecto de un factor dado en el rendimiento de la extracción para cada compuesto. Su valor absoluto es proporcional a la influencia del correspondiente factor en el proceso de SPME. Un signo positivo, indica un incremento en la eficacia de extracción cuando el factor cambia del nivel bajo al alto en el dominio del diseño, mientras que el signo negativo indica un comportamiento opuesto.

La tendencia fue similar para ambas fibras: la agitación resultó ser el factor más importante con un efecto positivo en la eficacia de la extracción, sobre todo para los compuestos más lipofílicos (TCS y MTCS), probablemente debido a sus bajos coeficientes de difusión en agua. La adición de cloruro sódico provocó una disminución de la señal para todos los compuestos, siendo significativa (95 % confianza) para el MTCS con ambas fases poliméricas, y para el TCS con PDMS-DVB. Por último, el pH parece ejercer un efecto negativo aunque no significativo en la extracción. En base a estos resultados, el pH se fijó en 4.5 unidades, un valor intermedio en el dominio del diseño, para asegurarse de que los compuestos estén en forma protonada (2 unidades por debajo de su pK_a). La agitación, dado que mejora significativamente la eficacia de extracción se mantuvo en 500 rpm durante el muestreo.

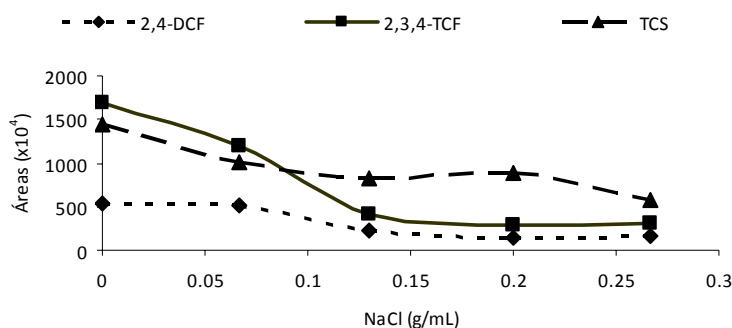
Tabla I.6. Coeficientes estandarizados de los efectos principales para los factores considerados en la optimización del proceso de SPME utilizando PA y PDMS-DVB.

	PA				PDMS-DVB			
	DCF	TCF	MTCS	TCS	DCF	TCF	MTCS	TCS
Agitación	2.1	2.3	12.0 ^a	9.5 ^a	3.2 ^a	2.3	8.7 ^a	26.0 ^a
NaCl	0.02	-0.07	-9.1 ^a	-1.8	-0.5	-0.7	-6.5 ^a	-5.5 ^a
pH	-0.8	-0.4	-2.5	-0.9	-0.9	-0.9	-0.6	-1.2

^a Factores estadísticamente significativos para un nivel de confianza del 95 %

Dentro del rango estudiado en el diseño, la adición de sal provocó una reducción en las respuestas de los analitos. En concreto para el caso del MTCS, con ambas fibras, y para el TCS, con la fibra de PDMS-DVB, el efecto fue estadísticamente significativo. Desde el punto de vista cinético la sal ralentiza la difusión de los analitos desde la muestra a la fibra, sobre todo para las especies lipofílicas. Por otro lado, atendiendo a la termodinámica de la SPME, debería resultar positiva para especies polares y no iónicas (por ejemplo, el 2,4-DCF y el 2,3,4-TCF). Por tanto, antes de fijar el valor óptimo de este factor, se re-evaluó su efecto a diferentes niveles. La figura I.6 muestra que, incluso para los fenoles, la eficacia de extracción (usando la fibra de PA) disminuye con la adición de cloruro sódico. Por tanto, se prescindió de la adición de sal para experimentos posteriores.

Figura I.6. Efecto de la sal en la extracción de los compuestos más polares (fibra de PA).



1.3.4. Volumen de muestra

El volumen de muestra está relacionado con la sensibilidad del método, de modo que se consigue la cantidad máxima de analito en la fibra cuando se llega al denominado volumen infinito. A partir de este punto, la cantidad de analito extraída es independiente del volumen de la muestra empleado y viene dado por

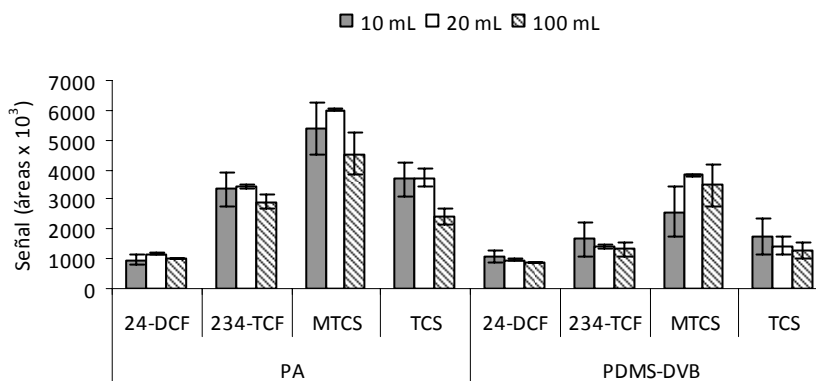
$$n = K_{fs} V_f C_0$$

Para evaluar la influencia de esta variable en la eficacia de extracción se realizaron una serie de experimentos utilizando volúmenes de muestra de 10, 20 y 110 mL, en viales de 11, 22 y 120 mL, conteniendo la misma concentración de los analitos (10 ng/mL) y considerando un tiempo de extracción de 30 minutos para ambas fibras (PA y PDMS-DVB), figura I.7. Tal como se puede observar en la gráfica, no hay diferencias significativas entre los volúmenes de 10 y 20 mL para ambas fibras.

Para 100 mL de agua, se apreció una pequeña disminución en la señal, principalmente para el TCS y MTCS con la fibra de PA. Este comportamiento puede deberse a problemas de agitación y, por lo tanto, una difusión menos eficaz de los analitos hacia la fibra.

El volumen de muestra utilizado en experimentos posteriores fue de 20 mL, no obstante en el caso de disponer de poca muestra, se puede reducir a 10 mL.

Figura 1.7. Influencia del volumen de muestra en la eficacia de la SPME (N=3).



1.3.5. Tiempo de extracción

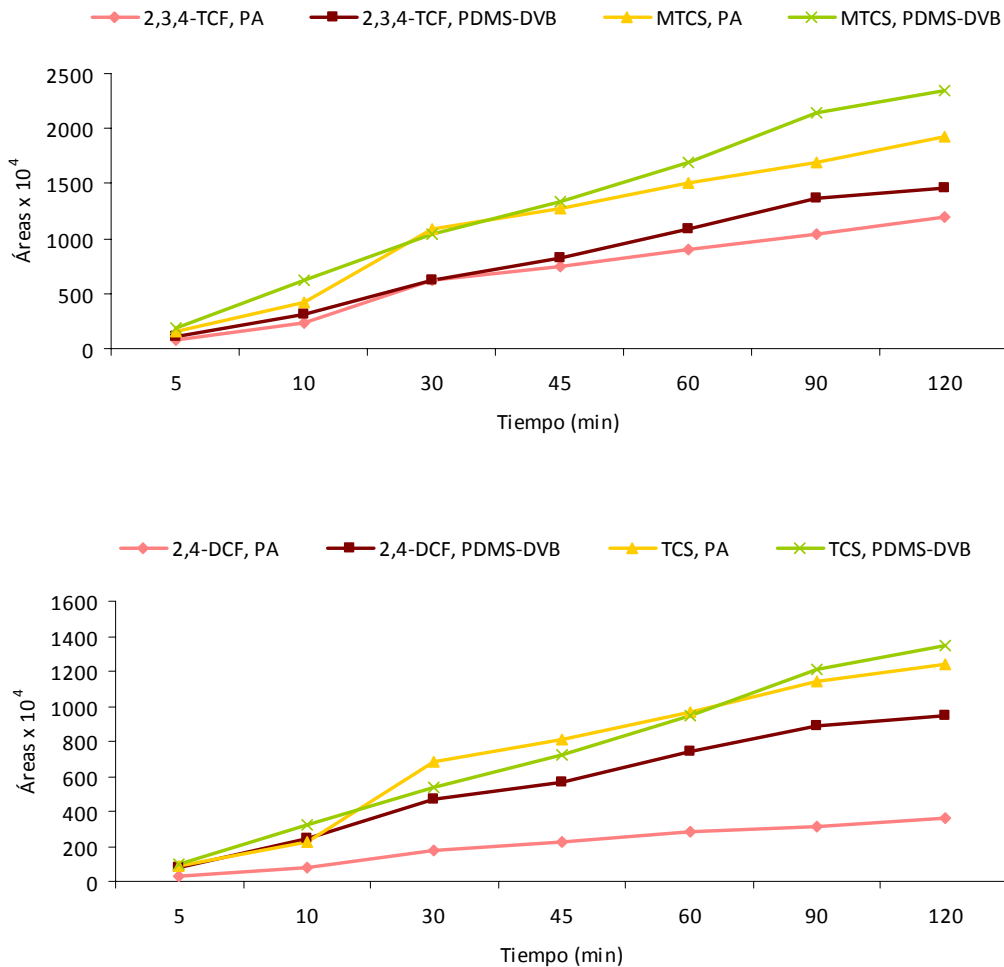
Uno de los aspectos a considerar en los métodos de SPME es la influencia del tiempo de extracción en la cantidad de analito concentrado sobre la fibra. Hasta alcanzar condiciones de equilibrio, el rendimiento de la extracción aumenta con el tiempo de exposición a la muestra.

Se realizó el estudio de la cinética de extracción para ambas fibras, utilizando 20 mL de agua, ajustada a pH 4.5, con un nivel de adición de los compuestos de 5 ng/mL. Los tiempos de extracción estudiados fueron 5, 10, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos. Posteriormente, se procedió a la derivatización de los analitos retenidos en la fibra, exponiéndola al espacio de cabeza de un vial con 50 μ L de MTBSTFA durante 20 minutos a 40°C, tras lo cual se desorbió en el inyector del sistema GC-MS.

En la figura 1.8 se puede observar que tras dos horas de muestreo todavía no se ha alcanzado el equilibrio. Por otra parte, cabe destacar la similitud en los perfiles de extracción de los compuestos con ambas fibras. La excepción fue el 2,4-diclorofenol, que presentó una mayor eficacia de extracción con la fibra de PDMS-DVB frente PA, dentro del intervalo de tiempo estudiado.

Debido a que no se alcanza el equilibrio tras dos horas de muestreo, éste ha de realizarse bajo condiciones cinéticas para que el procedimiento desarrollado sea aceptable desde el punto de vista del tiempo dedicado a la preparación de la muestra. Para ajustar la duración de la etapa de preparación de muestra (extracción y derivatización) a la de separación cromatográfica, se limitó el tiempo de muestreo a 30 minutos.

Figura 1.8. Cinéticas de microextracción para los analitos objeto de estudio.



1.3.6. Optimización de las condiciones de derivatización

El efecto del tiempo (10-40 minutos), temperatura (40-70°C) y volumen de derivatizante (20-100 µL) en la señal analítica (áreas de pico) se ha estudiado utilizando un diseño experimental a 2 niveles con 3 puntos centrales. La matriz de experimentos utilizada se muestra a continuación, tabla I.7.

Las extracciones se llevaron a cabo con muestras de agua ultrapura, a pH 4.5, con adición de los compuestos a nivel de 5 ng/mL. Tras un muestreo de 30 minutos, se expuso la fibra al espacio de cabeza de un vial conteniendo MTBSTFA, en las condiciones indicadas en la tabla I.7 para cada experimento. Los resultados obtenidos, en área de pico, se muestran en la siguiente tabla.

Tabla I.7. Matriz de experiencias y resultados obtenidos en la optimización de la derivatización on-fiber.

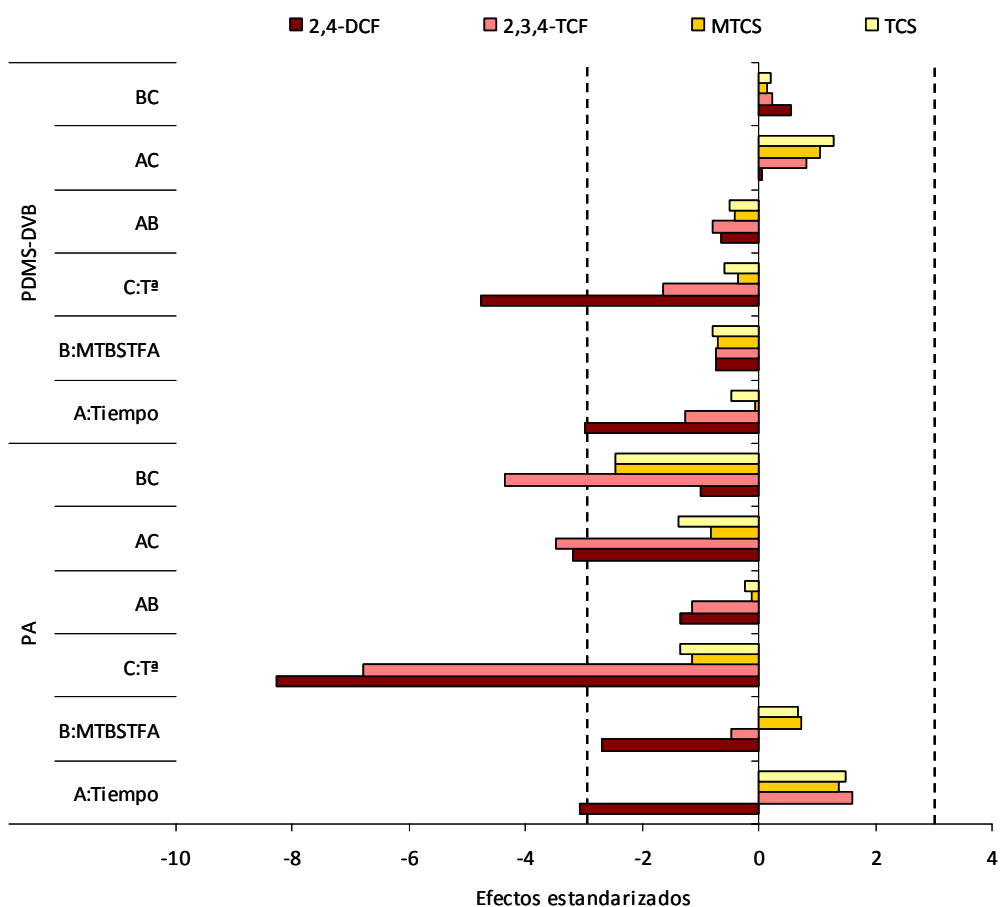
Exp.	Tª (°C)	Tiempo (min)	Vol. (µL)	PA (Área de pico x 10 ⁴)				PDMS-DVB (Área de pico x 10 ⁴)			
				DCF	TCF	MTCS	TCS	DCF	TCF	MTCS	TCS
1	55	25	60	136	576	1602	780	316	549	1290	590
2	70	10	20	155	520	1255	632	263	473	1125	488
3	40	40	100	165	691	1762	904	341	526	1344	559
4	70	40	100	56	393	1107	532	149	417	1212	504
5	40	40	20	211	619	1276	670	372	554	1299	550
6	40	10	20	181	521	1276	547	498	701	1759	771
7	70	10	100	117	471	1088	602	319	562	1401	606
8	55	25	60	129	556	1158	742	383	651	1750	712
9	70	40	20	91	527	1438	716	219	566	1724	711
10	40	10	100	193	596	1401	685	436	618	1355	609
11	55	25	60	144	514	1198	617	399	651	1613	681

Tras el tratamiento estadístico de los datos, se obtuvieron los valores de los coeficientes estandarizados para los efectos principales y las interacciones de orden dos entre factores, figura I.9. Sólo se encontraron factores estadísticamente significativos (95 % confianza) para el 2,4-DCF y el

2,3,4-TCF. En el caso del triclosán, ningún factor afectó a la eficacia de la derivatización, mientras que para el metiltriclosán, tal como es lógico, no hubo variación de la señal del mismo, figura I.9.

Para el 2,3,4-TCF y sobre todo para el 2,4-DCF, el tiempo y la temperatura afectaron significativa y negativamente a las respuestas obtenidas para ambas especies, lo cual puede ser explicado por una desorción parcial de estos compuestos durante la exposición de la fibra de SPME al agente derivatizante a temperaturas elevadas.

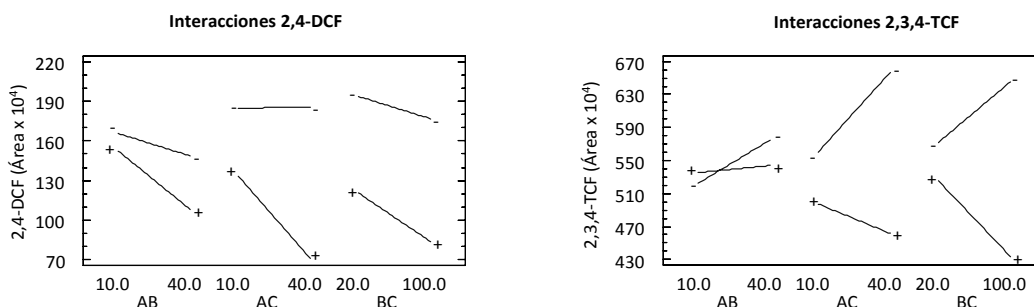
Figura I.9. Carta Pareto correspondiente a la optimización de las condiciones de derivatización on-fiber, usando MTBSTFA, para las fibras de PA y PDMS-DVB.



Por otra parte, la interacción tiempo-temperatura (AC) y volumen de MTBSTFA-temperatura (BC) influyeron también de modo negativo en las señales obtenidas para algunos compuestos con la

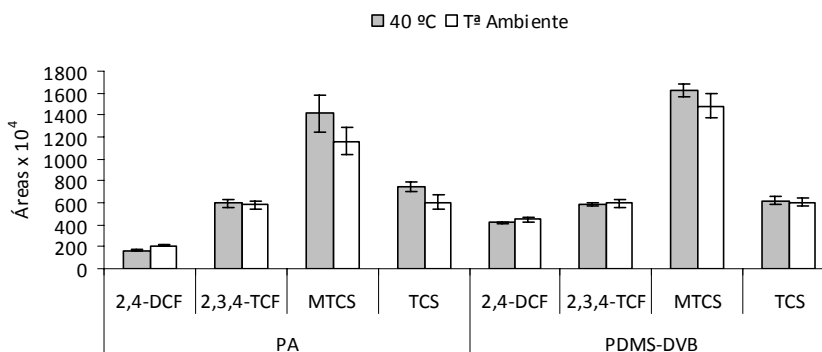
fibra de PA. Este comportamiento sugiere de nuevo la posibilidad de pérdidas en la etapa de derivatización a tiempos y temperaturas elevadas, además de desplazamiento de los analitos por el agente derivatizante, figura I.10.

Figura I.10. Gráficos de interacciones para el 2,4-DCF y el 2,3,4-TCF con la fibra de PA.



En vista de los resultados anteriores, el tiempo y el volumen de derivatizante se mantuvieron en sus valores bajos (10 minutos y 20 μ L de MTBSTFA, respectivamente) con objeto de minimizar la duración del método propuesto además del consumo de derivatizante. Al observar que una menor temperatura redundaba en mayores respuestas, se realizaron pruebas adicionales para evaluar la viabilidad de llevar a cabo la derivatización *on-fiber* a temperatura ambiente, figura I.11.

Figura I.11. Derivatización *on-fiber* a temperatura ambiente versus 40° C (N=3).



Tanto los valores medios de las respuestas obtenidas como sus coeficientes de variación, fueron similares en ambas condiciones para las dos fibras. Por conveniencia, en experimentos posteriores, la derivatización se llevó a cabo a temperatura ambiente, evitando así la necesidad de

utilizar sistemas de control de temperatura. Por lo tanto, las condiciones finales de derivatización *on-fiber* fueron 20 μL de agente derivatizante (MTBSTFA), temperatura ambiente ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) y 10 minutos, para ambas fibras.

1.3.7. Evaluación de los efectos de memoria

Después de la desorción de la fibra, en el puerto de inyección del cromatógrafo, pueden quedar restos de los analitos en la fase polimérica que darían lugar a problemas de contaminación en el análisis de la siguiente muestra. Por esa razón, es necesario evaluar si la temperatura y el tiempo de desorción utilizados son suficientes para eliminar completamente los analitos de la fibra. Tras la realización de un muestreo sobre agua con un nivel de adición de los analitos del orden de 3 ng/mL, con posterior derivatización e inyección en un GC-MS, se desorbió de nuevo la fibra para determinar los posibles restos de los analitos sobre la misma. Además, para poner de manifiesto la presencia de especies sin derivatizar en el recubrimiento, se repitió el experimento anterior pero exponiendo las fibras de nuevo a una fracción fresca del agente derivatizante, antes de la segunda desorción. Los porcentajes de señal, respecto a la primera desorción de la fibra, se muestran en la tabla I.8 para ambas fibras.

Tabla I.8. Señal relativa en la segunda desorción de las fibras de SPME.

% Señal relativa	PA				PDMS-DVB			
	24-DCF	234-TCF	MTCS	TCS	24-DCF	234-TCF	MTCS	TCS
2ª desorción	0.0	0.0	0.4	0.9	0.0	0.0	0.7	0.9
Derivatización + 2ª desorción	0.0	0.0	0.5	1.2	0.0	0.0	1.3	1.7

En primer lugar, cabe destacar la similitud entre los resultados obtenidos para las dos fibras. Se puede observar que, tras tres minutos de desorción, se eliminaron completamente los analitos más volátiles (2,4-diclorofenol y 2,3,4-triclorofenol) mientras que para el metiltriclosán y el triclosán los efectos de memoria representaron entre el 0.4 y el 1.7 % de sus áreas de pico en la primera desorción. Las señales relativas en la segunda desorción fueron similares tanto considerando la etapa adicional de exposición al agente derivatizante como sin considerarla, lo que indica que estas señales proceden de restos de los analitos derivatizados remanentes en la fibra después de su desorción durante 3 minutos a 270°C (PA) y 260°C (PDMS-DVB).

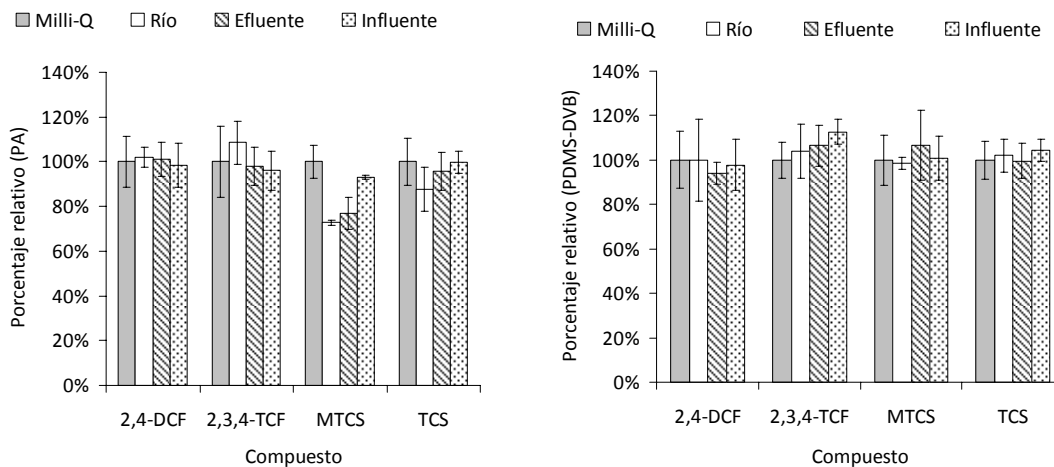
Para minimizar los efectos memoria, tras la primera desorción, las fibras se situaron en el inyector de otro sistema cromatográfico a la misma temperatura de desorción (270°C para PA y 260°C para PDMS-DVB) durante otros tres minutos. Tras esta segunda desorción, no se detectaron problemas de contaminación cruzada.

1.3.8. Efectos de matriz

Cuando un método analítico es aplicado a muestras reales, la señal obtenida puede variar en función de la matriz analizada. Concretamente en la técnica de SPME, puede producirse una disminución de la cantidad extraída al aumentar la complejidad de la muestra.

Para evaluar la posible existencia de efectos de matriz, se realizó una adición de la mezcla de los analitos en cuatro matrices distintas (*agua ultrapura, agua de río, agua residual tratada y sin tratar*) a nivel de 3 ng/mL. El análisis de las muestras, por triplicado, se realizó tal como se detalló en la parte experimental. Los resultados para cada uno de los analitos según la fibra seleccionada se muestran a continuación, figura I.12. En el caso de las aguas residuales se sustrajo, a la señal de las muestras con adición, el correspondiente blanco (muestra sin adición).

Figura I.12. Comparación de respuestas (% señal relativa a agua Milli Q) utilizando distintas matrices acuosas (N=3).

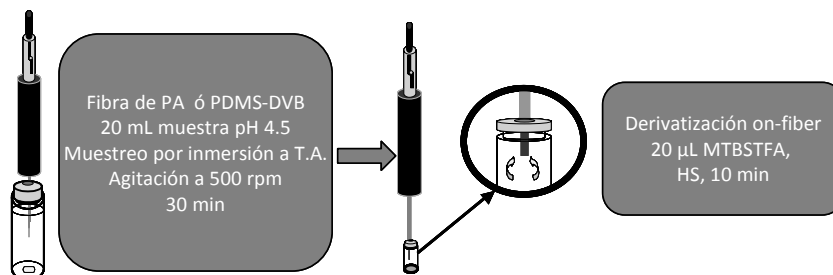


En general, estas figuras nos muestran que la eficacia de la extracción no se ve afectada por la naturaleza de la matriz, con lo cual no es necesario realizar adiciones a cada muestra, para cuantificar los niveles de estos compuestos en los distintos tipos de agua.

1.4. Caracterización del método analítico

El método analítico desarrollado, figura I.13, ha sido caracterizado en lo referente a linealidad, límites de cuantificación y exactitud, considerando como técnica de detección la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

Figura I.13. Esquema del proceso de SPME para la determinación de TCS, MTCS, 2,4-DCF y 2,3,4-TCF en agua.



1.4.1. Linealidad

Se procedió al estudio de la linealidad en las respuestas de los compuestos objeto de estudio para muestras con adición, a niveles de concentración comprendidos entre 0.03 ng/mL y 10 ng/mL. Se realizaron siete niveles de adición en el rango anterior de concentraciones sobre agua a pH 4.5. En la tabla I.9, se muestran las ecuaciones de las rectas de adición obtenidas para cada uno de los analitos con ambas fibras, y sus coeficientes de determinación (R^2). Como se puede comprobar la respuesta se mantuvo lineal en el rango evaluado.

Tabla I.9. Rectas de calibrado y coeficientes de determinación obtenidos con las dos fibras estudiadas, utilizando como técnica de determinación GC-MS.

		PA	PDMS-DVB
2,4-DCF	Ecuación	Y=180602X+5902	Y=409714X+37951
	R ²	0.999	0.999
2,3,4-TCF	Ecuación	Y=412432X+23768	Y=470739X+22327
	R ²	0.996	0.999
MCTS	Ecuación	Y=791457X-51462	Y=829610X-1374
	R ²	0.998	0.999
TCS	Ecuación	Y=836108X-10920	Y=837032X+21116
	R ²	0.999	0.999

1.4.2. Límites de cuantificación

Los límites de cuantificación (LOQs) se definen como la cantidad mínima de analito que puede ser cuantificada con fiabilidad, correspondiente a una relación S/N de 10. Los límites de cuantificación obtenidos para el método desarrollado con detección por GC-MS son los que se muestran en la tabla I.10.

Tabla I.10. Límites de cuantificación para el método desarrollado utilizando como técnica de determinación GC-MS.

		Fibra	2,4-DCF	2,3,4-TCF	MTCS	TCS
LOQ (ng/L)	PA		7	2	2	1
	PDMS-DVB		4	2	2	1

Comparando los LOQs de la metodología desarrollada en esta Tesis Doctoral, frente a otras basadas en la SPME para la determinación de clorofenoles en agua, se observa que utilizando la misma fibra y modo de muestreo son equivalentes o incluso inferiores que los obtenidos por otros autores tal como se aprecia en la tabla I.1 del presente capítulo [Guerra Simões N; 2007][Ribeiro A; 2002].

1.4.3. Repetibilidad del proceso

Se realizó un estudio de repetibilidad del proceso de muestreo y derivatización para las dos fibras evaluadas, utilizando como técnica de determinación GC-MS. Para ello, se analizaron, por quintuplicado, muestras de 20 mL de agua ultrapura a pH 4.5, con adición de los analitos a nivel de 0.5 ng/mL. Los resultados obtenidos se muestran a continuación, tabla I.11.

Tabla I.11. Estudio de repetibilidad utilizando como técnica de determinación GC-MS (N=5).

Adición en agua (ng/L)		PA (CV %)		PDMS-DVB (CV %)		
		Nº de ciclos de extracción previos				
		15	70	0	40	60
2,4-DCF	490	7.2	9.5	8.0	18.2	17.2
2,3,4-TCF	488	7.6	10.3	7.8	15.8	17.4
MCTS	519	9.2	6.8	6.4	23.3	21.1
TCS	497	8.7	8.0	5.9	21.3	17.5

La variabilidad obtenida con la fibra de PA es inferior, en todos los casos a 10 %, sin embargo se observa que hay una pérdida de repetibilidad al aumentar el número de ciclos de extracción-derivatización para la fibra de PDMS-DVB. Este comportamiento podría ser debido a la obturación de los poros del polímero de DVB debido a especies poco volátiles co-extraídas, incrementando así la variabilidad de los resultados.

1.4.4. Exactitud del método de SPME

La exactitud del método de SPME se evaluó con una muestra de agua residual sobre la cual se practicó una adición de los analitos a nivel de 1 ng/mL. Para la extracción de la muestra se empleó la fibra de PA en las condiciones seleccionadas, tanto para la muestra sin adición como para la muestra con adición. Una vez restada la señal para la muestra sin adición, se calculó la recuperación como la relación (en tanto por cien) entre la concentración encontrada y la concentración teórica añadida. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla.

Tabla I.12. Exactitud del método de SPME. Muestra con adición de 1 ng/mL.

	2,4-DCF	2,3,4-TCF	MTCS	TCS
<i>Añadido (ng/L)</i>	941	986	940	989
<i>Encontrado (ng/L)</i>	981±70	964±48	982±53	1005±62
<i>Recuperación %</i>	104.3	97.8	104.5	101.6

II. DETERMINACIÓN DE PARABENES EN AGUA MEDIANTE MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

2.1. Introducción

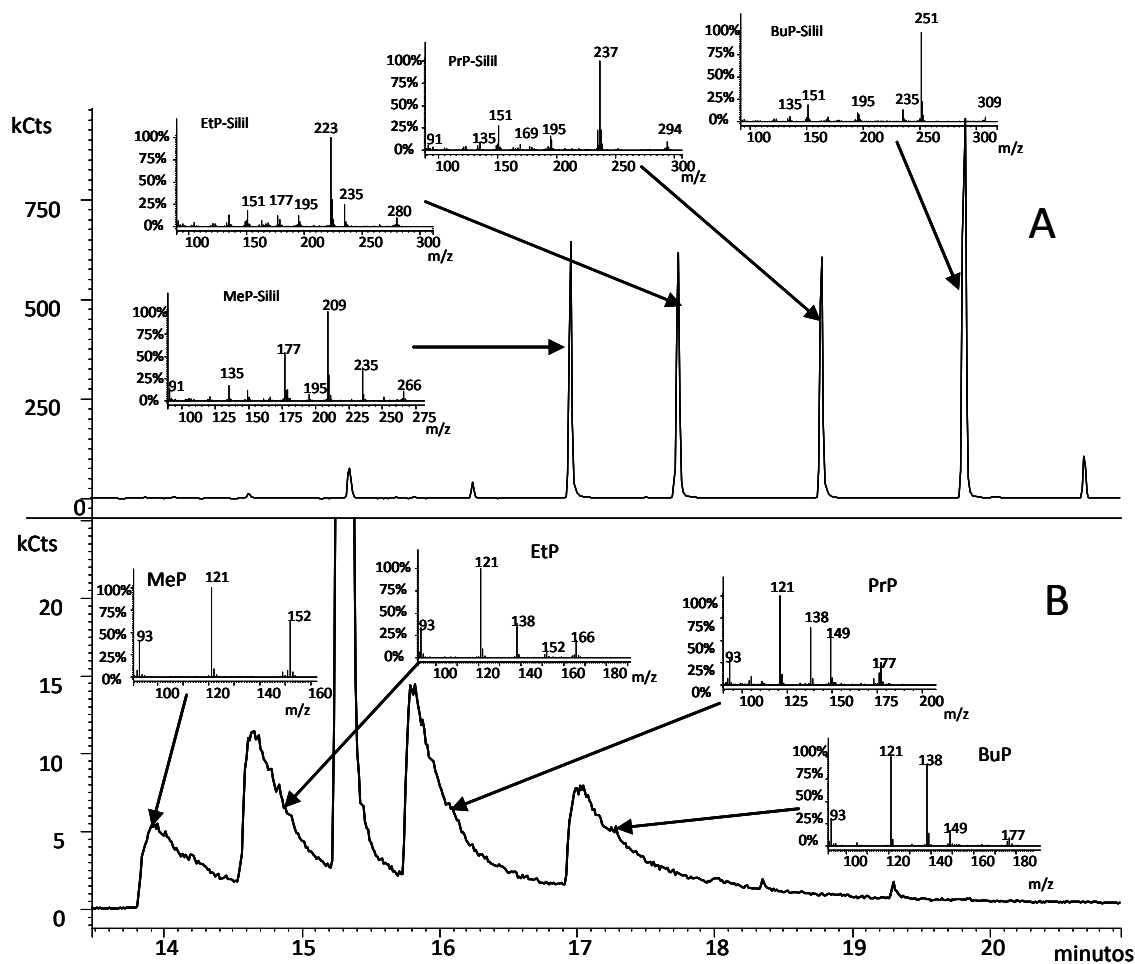
En esta sección de la memoria, se describe la aplicación de SPME a la extracción de los ésteres alquílicos y bencílicos del ácido *parahidroxibenzoico* en muestras de agua. Previamente al desarrollo de esta metodología [Canosa P; 2006 B], sólo existía una aplicación de SPME para la determinación de parabenos en formulaciones cosméticas. Lokhnauth y Snow [Lokhnauth JK; 2005] llevaron a cabo la optimización de los parámetros que afectan a la microextracción de estos compuestos, utilizando la espectrometría de movilidad iónica como técnica de determinación. Estos autores, compararon varias fibras (PDMS de 100 μm , PDMS de 7 μm , PA de 85 μm , PDMS-DVB de 65 μm y DVB-CAR-PDMS de 50/30 μm), considerando un tiempo de extracción de 15 minutos. Los mejores resultados, en lo referente a eficacia, fueron los obtenidos con PA, PDMS-DVB y DVB-CAR-PDMS, seleccionando finalmente la fibra triple ya que alcanzó el equilibrio en 15 minutos para muestras de cosméticos (50 mg) diluidas con 100 mL de agua. El pH del medio se mantuvo por debajo del pK_a de los compuestos y el porcentaje de cloruro sódico se fijó en un 20 %. Aunque la precisión obtenida con esta metodología ha sido aceptable (RSDs inferiores a 7 %), sus límites de cuantificación, del orden de 30 ng/mL, fueron muy superiores a los niveles presentes en aguas residuales y superficiales. Esto hace que sea necesario el desarrollo de una metodología más sensible para muestras de agua. Con este fin, además de derivatizar los analitos retenidos en la fibra, se decidió utilizar la espectrometría de masas en tándem, acoplada a cromatografía de gases, como técnica de determinación.

2.2. Experimentos previos

2.2.1. Elección del agente sililante y estudios preliminares de repetibilidad

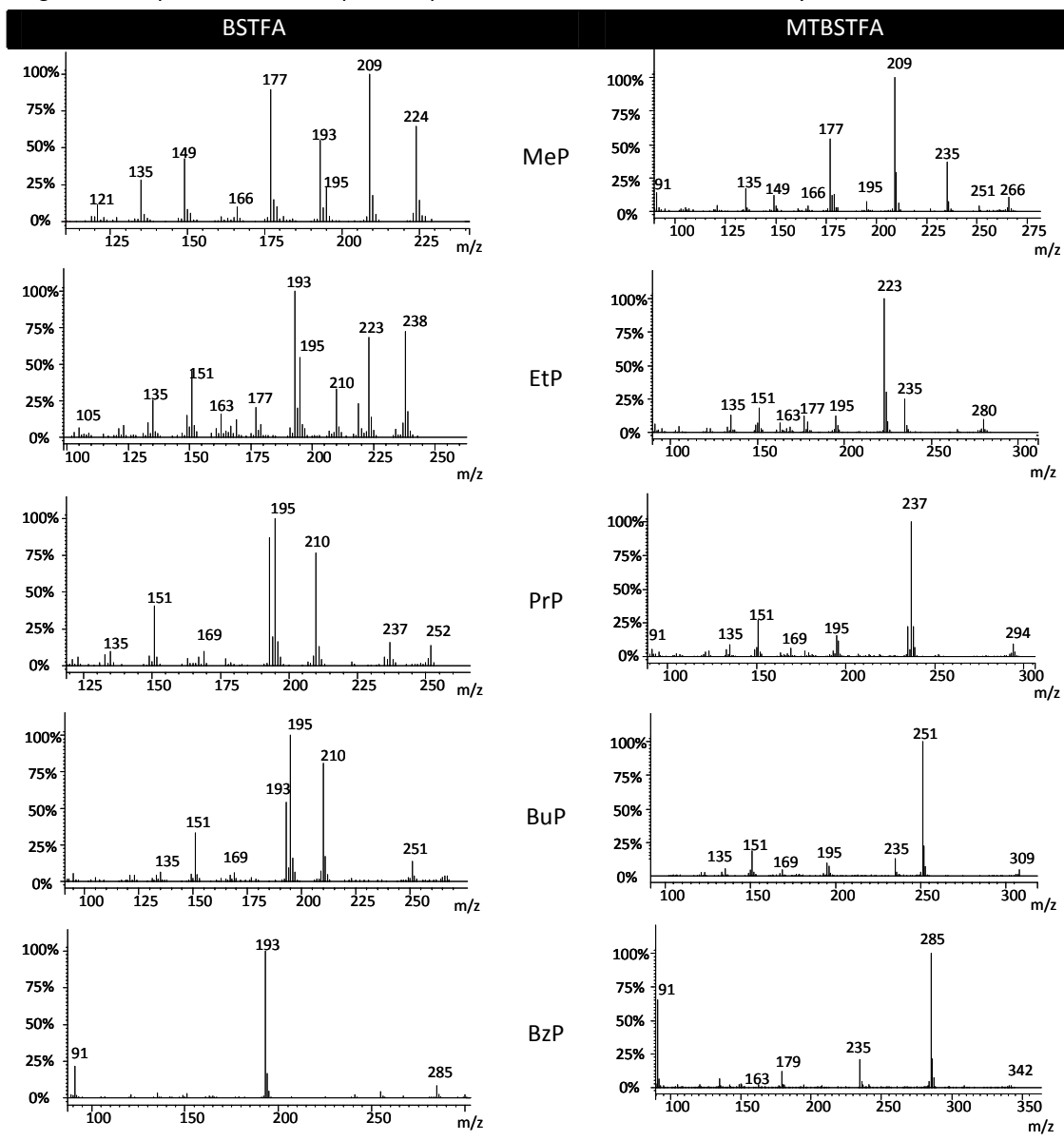
Los parabenos son derivados fenólicos susceptibles de sufrir, al igual que el triclosán y los clorofenoles, una reacción de derivatización cuando se ponen en contacto con un agente sililante. Para poner de manifiesto el incremento de sensibilidad, así como la mejora en la forma de pico, proporcionado por la derivatización se tomó una alícuota de 500 μL de un patrón de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en acetato de etilo (de MeP, EtP, PrP y BuP), y se mezcló con 20 μL de N-(tert-butildimetilsilil)-N-metiltrifluoroacetamida (MTBSTFA). Tras cinco minutos de reacción, se inyectó 1 μL de la mezcla en el sistema GC-MS. Así mismo, se ha inyectado el patrón sin proceder a la etapa previa de sililación. Los cromatogramas obtenidos se muestran en la figura II.1.

Figura II.1. Cromatograma reconstruido con los iones característicos del MeP, EtP, PrP y BuP sin derivatizar (B; m/z 121) y como derivados sililados (A, m/z 209, 223, 237, 251). Columna HP5-MS con 12 meses de uso.



La elección del agente derivatizante se hizo en base a los espectros de masas correspondientes a impacto electrónico, al utilizar bis-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) o N-(tert-butildimetil)-N-metil trifluoroacetamida (MTBSTFA) como agentes sililante, figura II.2.

Figura II.2. Espectros de masas para los parabenos derivatizados con BSTFA y MTBSTFA.



Como se puede observar en la anterior figura, la utilización de BSTFA como derivatizante proporciona espectros de masas con mayor fragmentación (a excepción del BzP) frente a la utilización de MTBSTFA, donde el pico base corresponde con el ión de $m/z [M-57]^+$. Dado que es un

fragmento intenso, es posible seleccionarlo como ión precursor a la hora de llevar a cabo la optimización de los parámetros de masas-masas para la determinación de los compuestos estudiados.

Una vez seleccionado el agente derivatizante, se evaluó la posibilidad de realizar la extracción de los compuestos con la fibra de poliacrilato, previamente utilizada para la extracción de triclosán y clorofenoles, y su posterior derivatización exponiéndola al espacio de cabeza de un vial conteniendo MTBSTFA. La extracción se llevó a cabo en una muestra de agua ultrapura, a pH 4.5, con adición de los analitos (20 ng/mL), durante 30 minutos y con agitación a 500 rpm. Tras la extracción, se procedió a la derivatización *on-fiber* de los compuestos exponiendo la fibra al espacio de cabeza de un vial conteniendo 20 µL de MTBSTFA, durante 15 minutos a temperatura ambiente. Los resultados obtenidos mostraron una variabilidad inferior al 11 % para todos los compuestos, tabla II.1.

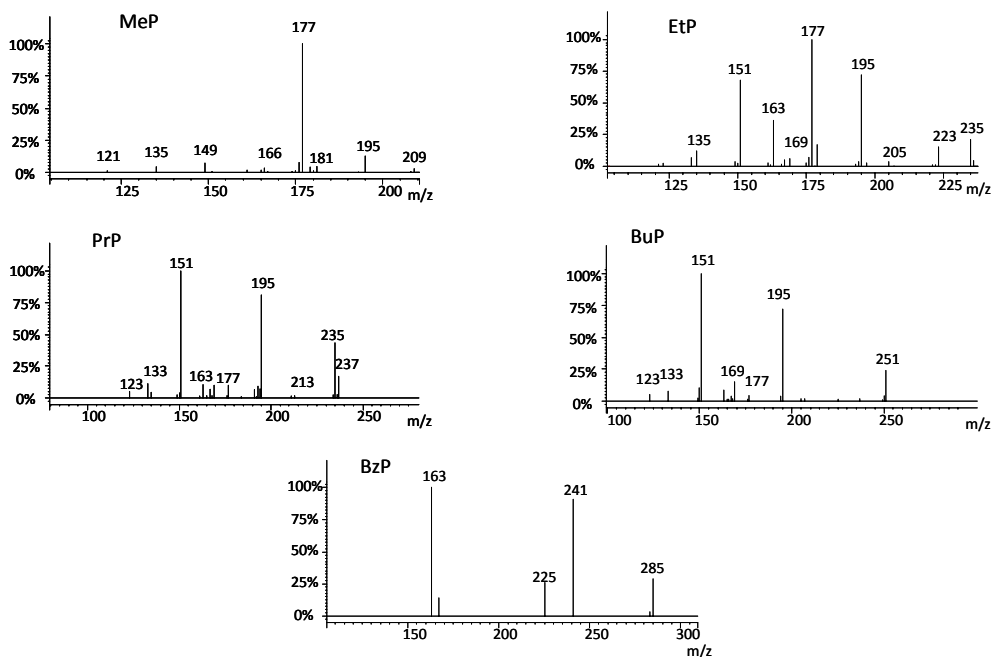
Tabla II.1. Repetibilidad (% RSD) del proceso SPME con derivatización *on-fiber* (N=5 réplicas). Pruebas preliminares.

MeP	EtP	PrP	BuP	BzP
11.0 %	8.4 %	4.8 %	4.4 %	5.2 %

2.2.2. Identificación cromatográfica

La identificación de los picos cromatográficos correspondientes a los analitos estudiados se realizó considerando sus tiempos de retención, así como los espectros de MS y MS/MS para sus derivados tert-butildimetilsililados. Para la optimización de las condiciones de MS/MS se inyectó un patrón en acetato de etilo, con una concentración de 0.5 µg/mL para cada componente, derivatizado con 50 µL de MTBSTFA. Con ayuda de la herramienta de desarrollo automatizado de métodos (*Automated Methods Development, AMD*) se optimizaron los parámetros que afectan a la fragmentación, como son el nivel de almacenamiento de excitación o *excitation storage level* y la amplitud de excitación. En el caso del MeP, EtP, PrP y BuP los espectros de MS/MS presentaron un patrón de fragmentación similar, correspondiente a la sustitución de la cadena alquílica por un protón (señales a m/z 195) seguido de pérdidas de CO₂ (señales a m/z 151), y/o agua (señales a m/z 177), figura II.3. Para el bencilparaben, su fragmentación resultó más compleja, presentando un ión producto a 241 correspondiente a la pérdida de CO₂ a partir del ión precursor (m/z 285). Un segundo ión producto de m/z 163 procede de la pérdida del anillo aromático (78 unidades) y CO₂ (44 unidades), figura II.3.

Figura II.3. Espectros de masas-masas obtenidos para los parabenos, tert-butildimetilsililados, en modo resonante.



Los tiempos de retención y las condiciones de detección en MS y MS/MS se muestran en la siguiente tabla.

Tabla II.2. Tiempos de retención y parámetros de MS/MS para la determinación de parabenos.

	Tr (min) ¹	ión precursor (m/z)	Nivel de almacenamiento (m/z)	Amplitud de excitación (V)	iones producto (m/z)	iones cuantificación (m/z)
MeP	15.80	209	92	0.5	195,177,149	177
EtP	16.58	223	98	0.5	195,177,163,151	195+177+151
PrP	17.60	237	104	0.5	195,163,151	195+151
BuP	18.62	251	110	0.5	195,151	195+151
BzP	22.37	285	90	0.4	241,225,163	241+163

¹ Columna HP5-MS

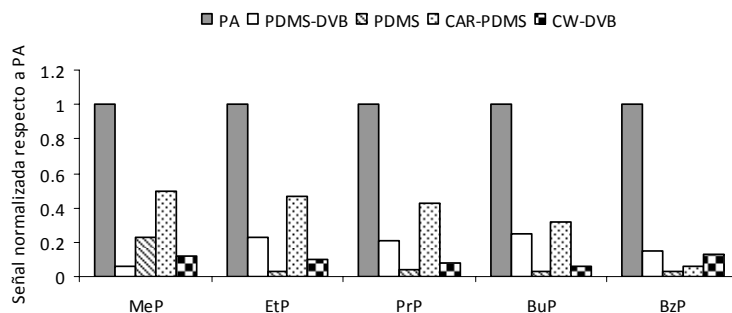
2.3. Optimización del proceso de SPME con derivatización *on-fiber*

Los distintos parámetros que afectan al proceso de SPME se han optimizado de modo sistemático para obtener eficacias de extracción adecuadas para la determinación de parabenos en muestras acuosas a niveles de las partes por trillón (ng/L). En todos los ensayos realizados, se empleó agua ultrapura con adición de los compuestos a nivel de 2 ng/mL, manteniendo las condiciones de derivatización utilizadas en las pruebas preliminares.

2.3.1. Recubrimiento de la fibra de SPME

Se estudió la eficacia de extracción de cinco fibras (PDMS, PDMS-DVB, PA, CAR-PDMS y CW-DVB) para la concentración de parabenos en muestras de agua ajustadas a pH 2.5. La extracción se llevó a cabo en la modalidad de inmersión, durante 20 minutos, a temperatura ambiente. Al igual que en el caso del triclosán, se tuvo en cuenta el rango de trabajo de las fibras para seleccionar la temperatura del puerto de inyección, considerando para todas ellas un tiempo de desorción de 3 minutos (tabla I.4 de este capítulo). Los resultados obtenidos se muestran en la figura II.4.

Figura II.4. Eficacias de extracción para las fibras de PDMS, PDMS-DVB, PA, CAR-PDMS y CW-DVB. Señal relativa a la fibra de PA.



Como se puede comprobar, las respuestas más elevadas corresponden a PA, seguida de CAR-PDMS (excepto para BzP) y PDMS-DVB. Estos resultados fueron comparables a los obtenidos por Lokhnauth y colaboradores, para el análisis de parabenos en productos cosméticos [Lokhnauth JL; 2005]. La afinidad de los compuestos por las fases poliméricas puede ser explicada en base a sus polaridades, siendo más afines a recubrimientos de naturaleza polar (PA) y semipolar (CAR-PDMS,

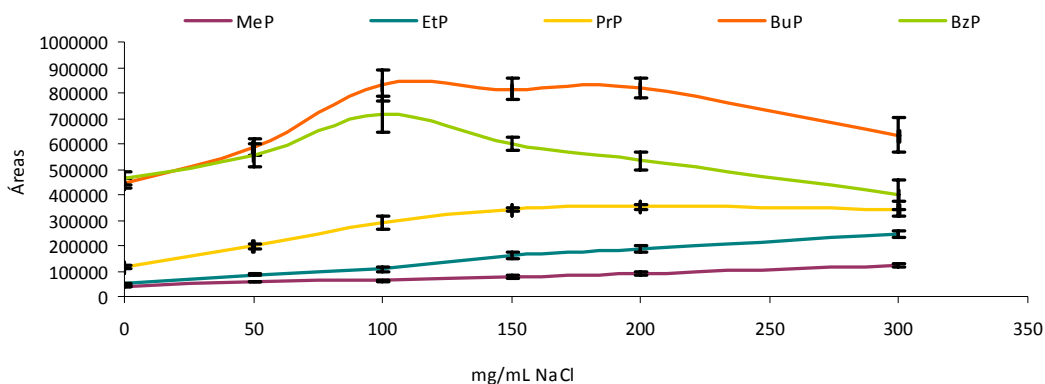
PDMS-DVB) frente a los de naturaleza apolar (PDMS). Sorprendentemente, la fibra de CW-DVB, también con carácter polar, proporcionó eficacias de extracción muy bajas.

2.3.2. Fuerza iónica del medio

La fuerza iónica puede afectar considerablemente a la eficacia de la extracción. La adición de cloruro sódico se utilizó para poner de manifiesto como varía la señal de los compuestos estudiados en función de la fuerza iónica del medio. En este estudio, se prepararon alícuotas de 18 mL de agua ultrapura, a pH 2.5, con concentraciones crecientes de cloruro sódico desde 0 hasta 300 mg/mL. El muestreo fue llevado a cabo usando la fibra de PA, por inmersión, durante un tiempo de 40 minutos. Tal como se aprecia en la siguiente figura (figura II.5), inicialmente se observó un incremento en las respuestas de los analitos hasta 100-150 mg/mL de cloruro sódico, manteniéndose constante, o incluso disminuyendo, para los compuestos más lipofílicos (BuP y BzP), a concentraciones de sal superiores.

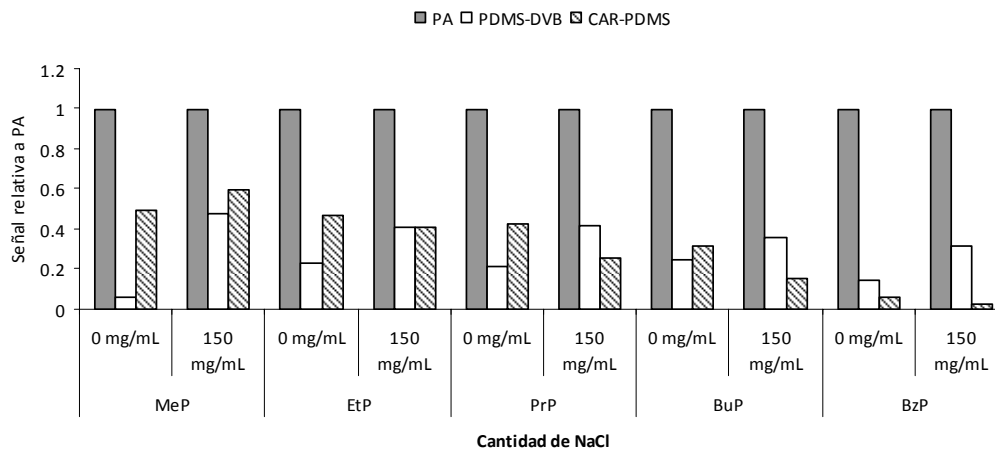
Teóricamente, la adición de sal provoca un incremento de la fuerza iónica del medio con el consecuente aumento de la cantidad de analito extraído por la fibra. Desde el punto de vista termodinámico, este comportamiento puede explicarse, para compuestos polares y no iónicos, como una interacción de las moléculas de agua con los iones salinos en lugar de con los analitos. Por otra parte, la presencia de grandes cantidades de sal, provoca un aumento de la viscosidad de la muestra que hace que la difusión de los analitos hacia la fibra sea más lenta, fenómeno que ya había sido observado para el triclosán.

Figura II.5. Influencia de la adición de sal en la eficacia de la SPME de parabenos. Fibra de PA, n=3 réplicas.



En base a estos resultados, se seleccionó 150 mg/mL como la concentración óptima de sal, ya que hasta este valor se observó un incremento en la respuesta de todos los compuestos. Bajo estas condiciones, se revisaron las eficacias relativas de extracción para los recubrimientos que proporcionaron las mayores respuestas en ausencia de sal: PA, PDMS-DVB y CAR-PDMS, figura II.6. De nuevo la fibra de PA proporcionó respuestas claramente superiores a las dos restantes, además se observó que las respuestas relativas obtenidas para PDMS-DVB aumentaron al añadir sal a las muestras, mientras que para CAR-PDMS se obtuvo el comportamiento contrario, sobre todo para los compuestos más lipofílicos.

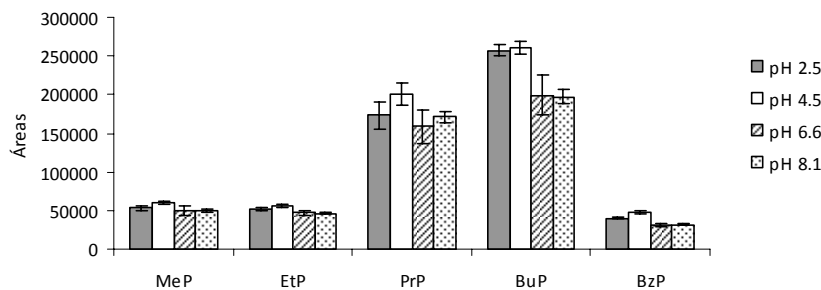
Figura II.6. Comparativa de respuestas obtenidas con PA, PDMS-DVB y CAR-PDMS. Muestras con sal (150 mg/mL) y sin sal, 40 minutos de muestreo.



2.3.3. pH y volumen de muestra

El efecto del pH en la eficacia de extracción fue evaluado considerando los parámetros anteriormente ajustados (150 mg/mL NaCl y PA). Su influencia se investigó a tres niveles distintos (2.5, 4.5 y 6.5), todos ellos, al menos, 2 unidades por debajo del pK_a de los compuestos (8.2-8.3). Así mismo, se realizaron también extracciones a pH 8.1, figura II.7. En conjunto, se observa que la eficacia de extracción es independiente del valor de pH considerado. Por tanto, en experimentos posteriores no se ajustó el pH de las muestras.

Figura II.7. Influencia del pH en la eficacia de extracción de los parabenos mediante SPME (N=3).



El volumen de muestra es otro factor a optimizar ya que de acuerdo con la teoría de la SPME para un sistema en dos fases, en condiciones de equilibrio termodinámico, la cantidad de analito extraído viene dado por

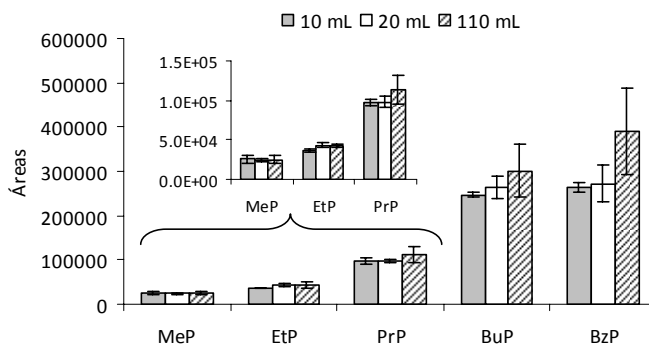
$$n = \frac{K_{fs} V_f C_0 V_s}{K_{fs} V_f + V_s}$$

De modo que a mayor volumen de muestra, mayor será la cantidad de analito extraída, hasta que el término $K_{fs} V_f$ sea más pequeño que V_s . A partir de este momento, la masa de analito extraída es independiente del volumen de muestra y su valor viene dado por la siguiente expresión:

$$n = K_{fs} V_f C_0$$

En base a estos argumentos, se realizaron extracciones considerando varios volúmenes diferentes de muestra (10, 20 y 110 mL) conteniendo los analitos a idéntico nivel de concentración. Los resultados obtenidos muestran que las eficacias son similares para todos los compuestos, con excepción del BzP que parece presentar un ligero incremento de señal al utilizar volúmenes de muestra mayores, en detrimento de su repetibilidad, figura II.8.

Figura II.8. Influencia del volumen de muestra en la eficacia de la extracción (N=3).

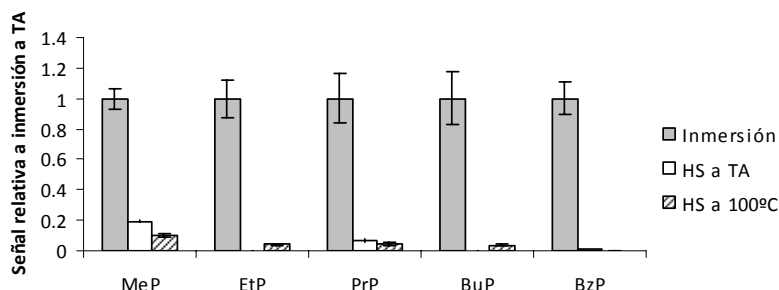


Teniendo en cuenta estos resultados, el volumen de agua empleado se limitó a 10 ó 20 mL (dispuesta en viales de 11 ó 22 mL) en función de la cantidad de muestra disponible.

2.3.4. Modo de muestreo y agitación

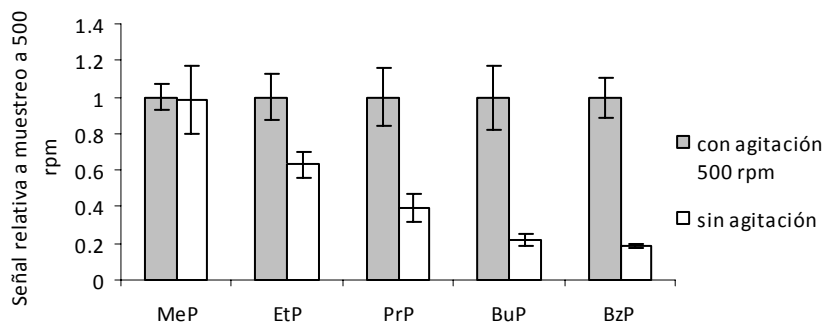
La eficacia de la extracción en SPME ha sido evaluada considerando tres modos diferentes de muestreo (inmersión a temperatura ambiente, espacio de cabeza -HS- a temperatura ambiente y HS a 100°C) para muestras de agua ultrapura, conteniendo 150 mg/mL de NaCl, durante un periodo de 40 minutos. Tras la derivatización, la fibra fue desorbida en el puerto de inyección del sistema GC-MS/MS, obteniendo los correspondientes registros cromatográficos. Los resultados revelaron que el muestreo en modo directo proporcionó mayores eficacias de extracción frente al espacio de cabeza, tanto a temperatura ambiente (TA) como a 100°C. Salvo en el caso del MeP, la respuesta obtenida con el muestreo en espacio de cabeza representa menos del 5 % de la correspondiente al muestreo por inmersión, figura II.9.

Figura II.9. Modo de muestreo para la fibra de PA. Señal relativa a muestreo por inmersión (N=3).



Una vez demostrado que la extracción por inmersión es la que proporcionó resultados óptimos, el efecto de la agitación se ha evaluado univariadamente. Se llevaron a cabo una serie de experimentos sin agitación y con agitación a 500 rpm, generando un vórtex homogéneo en el vial de la muestra. Los resultados obtenidos mostraron que la agitación favorece en gran medida la extracción de los compuestos de mayor log K_{ow} , ya que mejora su difusión en el medio acuoso desde el seno de la muestra a la superficie de la fibra, mientras que en el caso del MeP su efecto no resultó significativo, figura II.10.

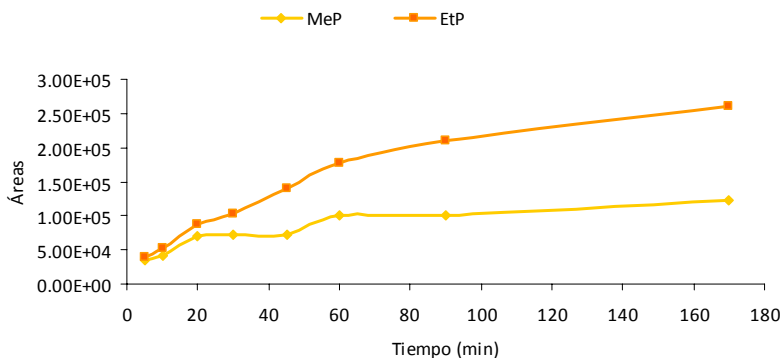
Figura II.10. Efecto de la agitación en la señal de los parabenes. Datos para SPME por inmersión con fibra de PA (N=3).

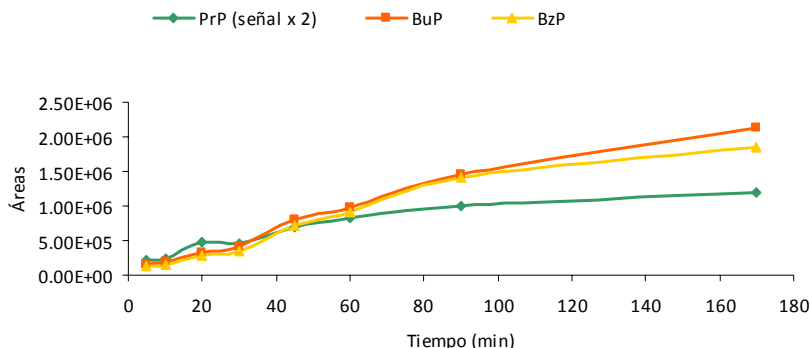


2.3.5. Tiempo de extracción

Una vez fijados el volumen de muestra (10 mL), la cantidad de NaCl (150 mg/mL), la agitación (500 rpm), el modo de muestreo (inmersión) y el tipo de fibra (PA), se evaluó el tiempo necesario para llegar a una situación de equilibrio en la extracción. Para la realización del estudio cinético, se prepararon una serie de muestras de agua ultrapura con adición de los parabenes a nivel de 2 ng/mL. Los tiempos de muestreo fueron de 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90 y 170 minutos, obteniendo los perfiles de extracción que se muestran en la figura II.11.

Figura II.11. Cinéticas de extracción para los parabenes.





Los gráficos anteriores revelan que 60 minutos de exposición fueron suficientes para alcanzar el equilibrio en el caso del MeP. Para EtP, PrP, BuP y BzP no se alcanzó el equilibrio dentro del intervalo de tiempo evaluado. Finalmente, se decidió limitar el tiempo de extracción a 40 minutos para incrementar la productividad del método, referida a número de muestras procesadas por unidad de tiempo.

2.3.6. Optimización de las condiciones de derivatización *on-fiber*

La temperatura, el tiempo de derivatización y el volumen de derivatizante son factores que afectan directamente a la derivatización sobre la fibra. Sus efectos potenciales en la señal de los parabenos derivatizados fueron evaluados simultáneamente, empleando un diseño factorial de modo mixto 3×2^2 , con dos puntos centrales, con ayuda del programa estadístico Statgraphics Plus 5.1. En este tipo de diseños, uno de los factores es estudiado a tres niveles dentro del espacio de las variables, de modo que es posible obtener el término cuadrático asociado al mismo. Dentro de los factores evaluados, la temperatura se seleccionó como la variable a estudiar a tres niveles: 20°C (temperatura ambiente), 45°C y 70°C. Volumen de derivatizante (20-80 μL) y el tiempo de derivatización (10-40 minutos) se estudiaron a dos niveles. Para tener suficientes grados de libertad y estimar así el error experimental, se incluyeron dos puntos centrales en el diseño.

Para llevar a cabo los experimentos se utilizaron 10 mL de agua ultrapura (con adición de los compuestos a nivel de 2 ng/mL), conteniendo 150 mg/mL de NaCl. El muestreo, con la fibra de poliacrilato, se llevó a cabo durante 40 minutos, con agitación a 500 rpm. Una vez finalizada la etapa de extracción, y secada la aguja de la jeringa de SPME, se procedió a la derivatización *on-fiber* en las condiciones indicadas en la tabla II.3. Los resultados obtenidos (área de pico) también se muestran en la siguiente tabla.

Tabla II.3. Matriz de experiencias para la optimización de las condiciones de derivatización on-fiber de los parabenos, y respuestas (áreas de pico) obtenidas mediante GC-MS/MS.

Temperatura (°C)	Volumen (μL)	Tiempo (min)	MeP	EtP	PrP	BuP	BzP
45	20	10	117125	172911	415511	884877	80787
20	80	10	157808	207277	536774	1090911	986334
70	80	40	69773	111101	267276	626188	587871
70	20	40	65599	112078	282820	629675	604691
20	80	40	90668	170129	360302	767988	629756
70	20	10	72742	140032	295392	691161	603352
20	20	40	75172	144829	338346	785112	723726
45	80	40	77366	143203	314748	685058	603486
20	20	10	89135	178071	389166	888333	773942
45	50	25	152782	141325	316257	905918	680502
45	80	10	78167	139644	312642	697832	653764
45	20	40	77435	154507	342570	810312	686343
70	80	10	66075	144235	353531	889005	807883
45	50	25	103420	154710	352565	843442	766278

El análisis de los datos anteriores mostró que ni el término cuadrático asociado con la temperatura, ni las interacciones de orden dos entre factores fueron estadísticamente significativos (95 % de confianza), con lo cual la interpretación de los resultados resultó sencilla debido a que los factores son independientes entre sí. Los efectos principales estandarizados se pueden observar en la tabla II.4. Estos se obtienen relacionando el valor del efecto estimado con el error, de modo que su valor absoluto es proporcional al cambio de respuesta del compuesto derivatizado cuando una determinada variable pasa del nivel inferior al superior, dentro del dominio del diseño. El signo indica si la eficacia en la derivatización incrementa (signo positivo) o si tiende a disminuir (signo negativo).

Tabla II.4. Valores estandarizados de los efectos principales asociados con los factores considerados en la optimización de la derivatización on-fiber de los parabenos.

	MeP	EtP	PrP	BuP	BzP
Temp. (°C)	-2.46 ^a	-4.36 ^a	-2.79 ^a	-2.24	-1.90
Tiempo (min)	-1.81	-2.70 ^a	-2.12	-2.20	-2.43 ^a
Vol. MTBSTFA (μL)	0.62	0.24	0.44	0.18	0.21

^a Factores estadísticamente significativos a un nivel de confianza de 95 %

Los resultados obtenidos mostraron que la temperatura y el tiempo son factores que afectan negativamente al rendimiento de la reacción de derivatización, siendo estadísticamente

significativos para MeP, EtP y PrP la temperatura, y para el EtP y BzP el tiempo. Por otra parte, el volumen de derivatizante resultó ser un factor no significativo. En base a estos resultados se seleccionó como tiempo, temperatura de derivatización y volumen de derivatizante óptimo 10 minutos, 20°C (temperatura ambiente) y 20 µL de MTBSTFA. Estas condiciones resultaron idénticas a las optimizadas para triclosán, 2,4-diclorofenol y 2,3,4-triclorofenol en la primera parte de este capítulo.

2.3.7. Evaluación de los efectos memoria

Al igual que para el triclosán, se evaluó la presencia de trazas de parabenos en la fibra de SPME una vez realizada la desorción de los analitos en el puerto de inyección del cromatógrafo. Tras realizar la extracción de una muestra de agua conteniendo 2 ng/mL de cada uno de los parabenos, y proceder a la desorción de la fibra de PA (270°C durante 3 minutos), se volvió a desorber durante otros 3 minutos. La señal obtenida para esta segunda desorción fue normalizada respecto a la registrada en la primera. Igualmente, se realizó la misma operación, pero antes de llevar a cabo la segunda desorción de la fibra, se expuso al espacio de cabeza de un vial conteniendo 20 µL de MTBSTFA, a temperatura ambiente, durante 10 minutos.

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla, en la cual se puede comprobar que en la segunda desorción se obtienen señales inferiores al 0.1 % para el MeP y el PrP. Cuando la fibra fue expuesta de nuevo al derivatizante estas señales aumentaron ligeramente, llegando al 0.2 %. La distribución de los parabenos sobre la fibra, a la hora de evaluar los efectos memoria, resultó ser similar al existente en los cosméticos (mayor cantidad de MeP y PrP), lo que sugiere que su presencia sobre el polímero puede ser debida a la contaminación existente en las atmósferas interiores, o introducida por el operador durante el proceso de SPME, más que a efectos de memoria propiamente dichos [Rudel RA; 2003].

Tabla II.5. Señal relativa en la segunda desorción de la fibra de SPME.

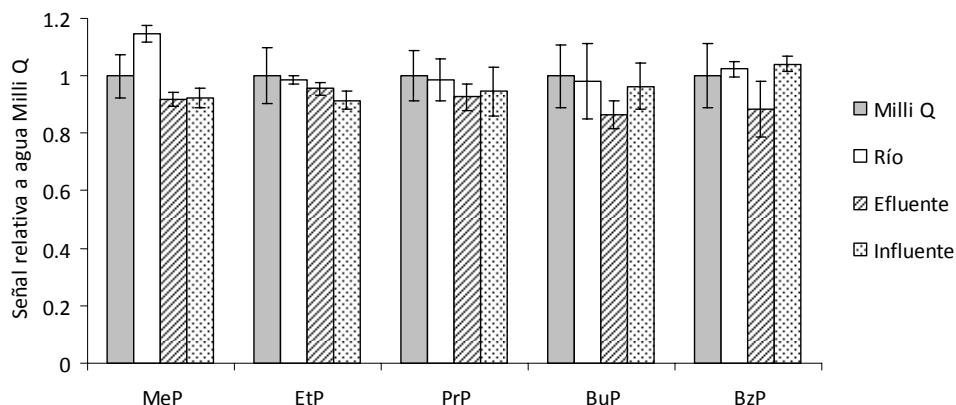
Porcentaje de señal relativa (%)	MeP	EtP	PrP	BuP	BzP
2ª desorción	0.15	0.00	0.03	0.00	0.00
Derivatización + 2ª desorción	0.23	0.00	0.12	0.00	0.00

2.3.8. Efectos de matriz

La presencia de otras sustancias (ácidos húmicos, macromoléculas, etc) en la matriz acuosa puede afectar en gran medida a la eficacia de extracción en SPME. Para investigar como afecta el tipo de agua al rendimiento del método propuesto, se utilizaron cuatro matrices diferentes: agua ultrapura, agua de río, agua residual tratada (efluente) y agua residual sin tratar (influyente). Todas estas muestras fueron fortificadas con los analitos a nivel de 2 ng/mL, y analizadas en las condiciones descritas anteriormente. Cabe destacar que aquellas que presentaron materia en suspensión fueron pasadas a través de filtros de fibra de vidrio con un tamaño de poro de 1 μm . Las muestras sin adición también fueron analizadas para tenerlas en cuenta a la hora de cuantificar los niveles encontrados.

En la figura II.12 se comparan las respuestas obtenidas para cada matriz. Los resultados, correspondientes a extracciones en triplicado, se representaron como señal relativa a la obtenida para muestras de agua ultrapura. En base a ellos, se puede afirmar que la señal de los compuestos es independiente del tipo de muestra, de modo que sería posible llevar a cabo su cuantificación usando una calibración externa sobre agua ultrapura, en lugar de recurrir a realizar adiciones sobre cada muestra a procesar.

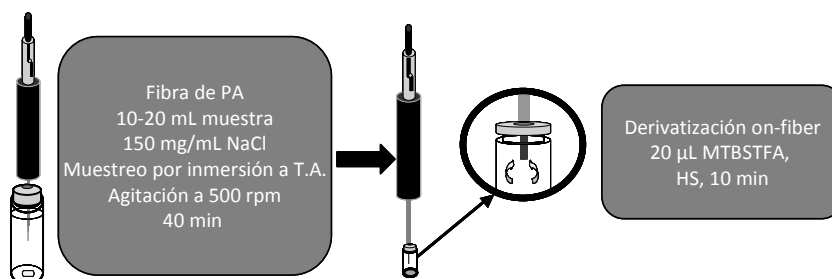
Figura II.12. Comparación de respuestas (% de señal relativa a agua Milli Q) para los parabenes en distintas matrices acuosas.



2.4. Caracterización analítica del método propuesto

Una vez optimizadas las condiciones de SPME y derivatización *on-fiber* con MTBSTFA, figura II.13, se procedió a la caracterización del método propuesto en base a su linealidad, repetibilidad, exactitud y límites de cuantificación, utilizando la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas en tándem como técnica de detección.

Figura II.13. Esquema del método desarrollado basado en la microextracción en fase sólida y derivatización *on-fiber* para la determinación de parabenos en muestras de agua.



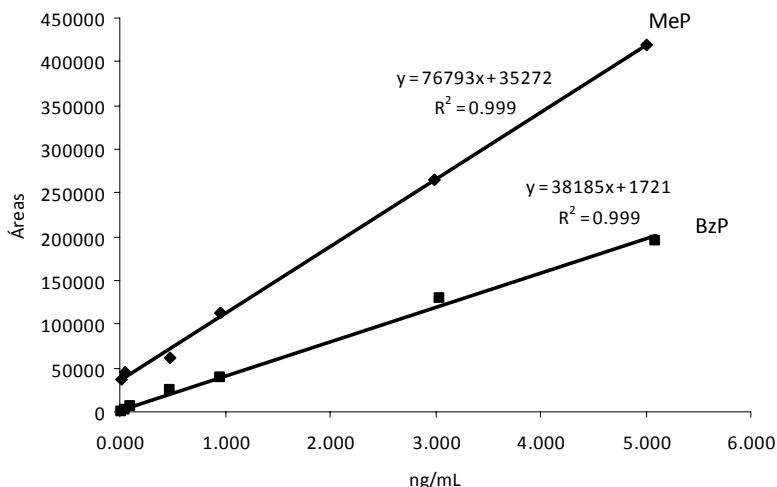
2.4.1. Linealidad

La linealidad del método fue evaluada utilizando muestras de agua ultrapura con adición de los compuestos a concentraciones crecientes desde 0.02 hasta 5 ng/mL. Los coeficientes de determinación oscilaron entre 0.996 y 0.999 dependiendo del compuesto, tabla II.6. Como se puede comprobar en la figura II.14, la respuesta se mantiene lineal para el rango de concentraciones estudiado.

Tabla II.6. Rectas de calibrado y coeficientes de determinación para los parabenos utilizando GC-MS/MS como técnica de detección.

	MeP	EtP	PrP	BuP	BzP
Ecuación	$Y=76793X+35272$	$Y=77914X+7808$	$Y=265044X+29999$	$Y=360160X+17191$	$Y=38185X+1721$
R^2	0.999	0.997	0.998	0.996	0.999

Figura II.14. Curvas de calibrado para MeP y BzP en un rango de concentraciones comprendidas entre 20 ng/L y 5 ng/mL.



2.4.2. Límites de cuantificación del método

Para evaluar los límites de cuantificación del método propuesto, se tuvieron en cuenta los blancos del procedimiento analítico. Una vez realizado el muestreo en las condiciones óptimas, se observó la presencia de una pequeña señal de MeP equivalente a una concentración del orden de 5-10 ng/L en muestra en los blancos de agua ultrapura, mientras que para los demás compuestos, la señal resultó despreciable. En base a esta observación, los límites de cuantificación estimados (correspondientes a una relación S/N=10) se muestran en la tabla II.7.

Tabla II.7. Límites de cuantificación para los parabenos aplicando la metodología SPME-derivatización on-fiber y detección mediante GC-MS/MS.

LOQ	MeP	EtP	PrP	BuP	BzP
ng/L	25	5	2	1	5

El origen de la señal de MeP en los blancos fue investigado considerando diversos factores por separado. Ni los septas de teflón, ni el agua ultrapura, ni el NaCl, ni el agitador magnético parecen ser las causas de la presencia de MeP en la fibra, ya que cuando se tomó una fibra nueva acondicionada, y ésta fue expuesta a un vial conteniendo 20 µL de MTBSTFA, la señal obtenida permaneció prácticamente constante, tabla II.8.

Tabla II.8. Contribución de diferentes factores a la señal de MeP en los blancos.

Factor	Procedimiento	MeP (Área de pico)
Agitadores magnéticos	Muestreo de Milli Q sin agitación, con NaCl (150 mg/mL), fibra de PA y exposición al derivatizante	2966
Septas téflon	Muestreo de Milli Q con agitación, NaCl (150 mg/mL), fibra de PA y exposición al derivatizante. No se encapsula el vial	3900
NaCl	Muestreo de Milli Q, agitación, fibra de PA y exposición al derivatizante	2789
Agua Milli Q	Derivatización sobre la fibra de PA sin muestreo previo	2662
Derivatizante	Utilizar un nuevo lote de derivatizante para exponer la fibra sin muestreo previo	3685
Fibra	Fibra nueva	39
	Expuesta al derivatizante	3671

La presencia de MeP en la fibra de SPME previamente al uso de la misma, indica que éste compuesto puede proceder de la atmósfera del laboratorio [Rudel RA; 2003] y/o de las resinas que se utilizan para adherir la fibra de sílice al cuerpo de acero de la aguja de SPME [Braun P; 2003]. Por lo tanto, para evitar falsos positivos en la determinación de MeP en agua mediante SPME, es preciso verificar de forma sistemática la señal de los blancos.

2.4.3. Repetibilidad del método

La repetibilidad del método propuesto fue evaluada utilizando muestras de agua ultrapura fortificadas con los parabenos a diferentes niveles de concentración. Las extracciones se llevaron a cabo por cuadruplicado en las condiciones descritas en la figura II.13. Los resultados obtenidos muestran una buena precisión incluso a niveles próximos a los LOQs, tabla II.9.

Tabla II.9. Repetibilidad (% RSD) del proceso de microextracción y derivatización on-fiber (N=4).

ng/L	MeP	EtP	PrP	BuP	BzP
20 ^a	11.9	7.3	7.3	10.4	7.6
200	10.7	8.5	1.1	5.5	13.3
500	8.3	6.3	2.4	4.7	9.0

^a 50 ng/L para MeP

2.4.4. Exactitud del proceso de SPME

Se evaluó la exactitud del método desarrollado usando agua de río con adición de los compuestos a dos concentraciones diferentes: 200 y 1000 ng/L. Fue necesario analizar la presencia previa de los mismos en el agua, y tenerla en cuenta para el cálculo de la exactitud. Los resultados obtenidos, tabla II.10, mostraron que el método de SPME permite evaluar de manera fiable las concentraciones de los parabenos en muestras de agua, con una exactitud y precisión alrededor del 10 %.

Tabla II.10. Exactitud del método de SPME para muestras de agua de río con adición (N=3).

	Con. añadida (ng/mL)	Con. medida (ng/mL)	Exactitud	Con. añadida (ng/mL)	Con. medida (ng/mL)	Exactitud
<i>MeP</i>	0.21	0.22±0.02	105 %	1.01	1.13±0.03	112 %
<i>EtP</i>	0.21	0.23±0.01	109 %	1.01	1.06±0.08	105 %
<i>PrP</i>	0.23	0.22±0.03	96 %	1.12	1.26±0.06	112 %
<i>BuP</i>	0.21	0.20±0.02	95 %	1.02	1.09±0.04	107 %
<i>BzP</i>	0.21	0.20±0.03	95 %	1.02	1.08±0.09	106 %

III. ESTUDIO DE LA FORMACIÓN DE DERIVADOS HALOGENADOS DEL TRICLOSÁN Y PARABENES EN AGUA CLORADA

3.1. Introducción

En este capítulo de la Tesis se investiga la reactividad del triclosán y los parabenes en aguas cloradas, evaluando el riesgo de formación de subproductos halogenados cuando estas especies, bien de una forma directa o a través de productos de cuidado personal, entran en contacto con agua de grifo clorada. Para ello, además de considerar las posibles reacciones que pueden dar lugar a estos compuestos, se desarrolló una metodología analítica sencilla para la extracción de los analitos de partida y sus posibles derivados en muestras acuosas.

3.1.1. Antecedentes bibliográficos

Una de las líneas de investigación de mayor actualidad, en relación con la presencia de contaminantes emergentes en el medio acuático, es el estudio de las posibles reacciones de transformación de estas especies, la identificación de los productos que generan y la estimación de la estabilidad de los mismos, su persistencia y toxicidad en el medio ambiente [Richardson SD; 2005 y 2006]. En el medio acuático, las reacciones de transformación más importantes son de tipo fotoquímico y redox. Dentro de la reactividad por vía fotoquímica, el triclosán es un compuesto que sufre importantes transformaciones en el medio ambiente, dando lugar a compuestos tóxicos como la 2,8-dibenzo-*p*-dioxina [Sánchez-Prado L; 2006 A]. En el caso de las reacciones redox, estas se producen con reactivos que se introducen de un modo intencionado en el medio acuático para eliminar compuestos de naturaleza orgánica. Dentro de los agentes oxidantes, el cloro libre (combinación del ácido hipocloroso e hipoclorito de sodio) es el más utilizado junto con el ozono, el dióxido de cloro y la cloramina. El cloro libre sigue siendo empleado hoy en día para desinfectar las aguas de consumo y asegurar su calidad bacteriológica. Incluso a aquellas aguas tratadas previamente con ozono o radiación ultravioleta, se les añade posteriormente una cantidad de cloro residual para que mantengan su asepsia a lo largo de las redes de distribución en las grandes ciudades. En algunos países, el cloro libre es usado también en los tratamientos terciarios aplicados en las estaciones depuradoras de aguas residuales urbanas. Los compuestos orgánicos, en presencia de estos agentes oxidantes pueden reaccionar dando lugar a especies con características distintas a los productos de partida. En algunos casos, estos subproductos son especies volátiles fácilmente eliminables, aunque tóxicos, como los trihalometanos; aunque, también puede dar lugar a otros productos tóxicos y más persistentes que los analitos de partida [Gallard H; 2002][Huber MM; 2005][Richardson SD; 2003].

Los compuestos que contienen grupos fenólicos en su estructura presentan unas cinéticas de cloración muy favorables [Gallard H; 2002][Alum A; 2004][Patnaik P; 2000]. Estas reacciones, de sustitución electrófila aromática, están favorecidas por la presencia del grupo hidroxilo que aumenta la densidad electrónica del anillo bencénico, debido a los pares de electrones no compartidos del oxígeno que se deslocalizan por los enlaces tipo π , principalmente en las posiciones en *orto* y *para* al mismo. Esto hace que el fenol, por ejemplo, sea 1000 veces más reactivo frente al benceno y que se formen principalmente productos de halogenación en *orto* y *para* al grupo hidroxilo frente a las sustituciones en *meta*, las cuales no están favorecidas ni desde el punto de vista cinético ni termodinámico.

Estudios de cloración de fármacos (estradiol, etinilestradiol, ibuprofeno, ketoprofeno,...) y otros productos de cuidado personal (filtros solares) mostraron la posibilidad de sufrir reacciones de transformación en presencia de cloro [Pinkston KE; 2004][Nogueira N; 2007], dióxido de cloro [Huber MM; 2005] y ozono [von Gunten U; 2003], siendo las ozonizaciones aquellas que presentan cinéticas más rápidas, seguidas de las cloraciones con dióxido de cloro, y por último, cloro libre [Huber MM; 2005]. El pH es un factor muy importante en algunas de estas reacciones, ya que en el caso de los fenoles, la forma fenolato es la más reactiva y en el caso de las aminas, la forma básica es la que presenta mayor reactividad. En lo referente al cloro libre, considerado como la suma de concentraciones de ácido hipocloroso y el hipoclorito, la forma ácida es la reactiva, de modo que los pHs óptimos de reacción para especies fenólicas serán los comprendidos entre el pK_a del compuesto y el pK_a del ácido hipocloroso [Pinkston KE; 2004].

En el caso del triclosán, experimentos realizados en 1987 pusieron ya de manifiesto la formación de derivados halogenados en medio acuoso conteniendo cloro libre. El grupo de Kanetoshi [Kanetoshi A; 1987] estudió la formación de derivados clorados del triclosán cuando materiales textiles, productos de cuidado personal y plásticos, que contenían este bactericida, eran puestos en contacto con concentraciones elevadas de cloro libre. Los productos que se detectaron fueron dos tetras y un pentacloro fenoxifenol (closanos). Onodera y su grupo [Onodera S; 1987] confirmaron la formación de estos compuestos cuando trataban aguas residuales, conteniendo triclosán, con hipoclorito sódico durante una hora. A diferencia de los primeros autores, identificaron otros dos productos de degradación, el 2,4-diclorofenol y el 2,3,4-triclorofenol. Años más tarde, en 2005, paralelamente a las investigaciones llevadas a cabo en esta Tesis Doctoral, Rule y colaboradores [Rule KL; 2005] obtuvieron resultados análogos a los observados con condiciones diferentes a las nuestras. En su trabajo, el triclosán se encontraba en exceso (0.72-8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) frente al hipoclorito sódico (0.192-1.77 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en disoluciones tamponadas con bicarbonato sódico. La determinación por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) de los compuestos derivatizados con bromuro de pentafluorobencilo, reveló la presencia de los dos tetras y

el pentacloro fenoxifenol, así como de 2,4-diclorofenol en el medio de reacción. Los productos finales de cloración del triclosán fueron ácidos carboxílicos clorados y trihalometanos.

Los mismos productos de halogenación del triclosán, descritos en esta Tesis Doctoral [Canosa P; 2005 A], han sido hallados en estudios posteriores por Greyshock y colaboradores [Greyshock AE; 2006] cuando evaluaron la reactividad del bactericida con exceso de monocloramina. La cinética de degradación del triclosán fue entre 2 y 4 veces más lenta que con cloro libre, y además, no se detectaron los productos de ruptura del mismo cuando existe exceso de triclosán frente a la monocloramina. Por otra parte, el grupo de investigación de Fiss [Fiss EM; 2007], basándose en los estudios de Canosa y colaboradores [Canosa P; 2005 A y 2006 A], estudió que sucedía cuando un producto conteniendo triclosán en su formulación (1.2-3 mg/g) se añadió sobre agua con 2 µg/mL de cloro libre. En menos de un minuto se había consumido todo el triclosán, dando lugar a varios subproductos de cloración y de ruptura del enlace éter existente entre los dos anillos aromáticos del compuesto, así como cloroformo como producto final.

El caso de los parabenes, el trabajo realizado en esta Tesis Doctoral es el único, hasta el momento, en el cual se ha estudiado su reactividad en agua clorada. Algunas referencias sobre subproductos del ácido *parahidroxibenzoico* y del *metahidroxibenzoico*, mostraron que el primero precisó una mayor concentración de cloro para reaccionar frente al segundo, además de presentar una cinética muy lenta, ya que el grupo carboxílico actúa como desactivante cuando está ionizado, puesto que disminuye la densidad electrónica en el anillo aromático [Chang E; 2006]. Shaydullina y colaboradores [Shaydullina GM; 2005] estudiaron la formación de subproductos de oxidación para el ácido *ortometoxibenzoico* en presencia de ozono y cloro libre. En el primer caso, observaron la ruptura del anillo bencénico y la formación de diversos productos de oxidación, mientras que en el segundo, la halogenación se produjo en las posiciones *orto* y *para* al grupo -OMe, así como sustituciones del -COOH por -Cl. Las impurezas que presentaba el reactivo de cloración dieron lugar a la aparición de los productos bromados. La presencia de haluros (bromuros o yoduros) en un medio conteniendo un agente oxidante, como es el hipoclorito, provoca la formación de compuestos halogenados debido a la oxidación inicial que sufren a bromo o yodo, y posterior ataque electrófilo al anillo aromático. La presencia de estas sales puede ocurrir de modo natural, sobre todo en acuíferos situados en zonas costeras, a niveles comprendidos entre 1-40 µg/L en agua de lluvia, 20-150 µg/L en agua de río y 65 mg/L en agua de mar [von Gunten U; 2003][Inaba K; 2006]. Cabe destacar que la formación de compuestos bromados es 10 veces más rápida que los clorados. Por otra parte, estudios de toxicidad, con ácidos haloacéticos, pusieron de manifiesto que los compuestos bromados presentan una mayor toxicidad que los clorados [Richardson SD; 2003].

3.1.2. Concentración de las muestras

La técnica más habitual para la preparación de muestras acuosas es la extracción en fase sólida (SPE), permitiendo concentrar de forma paralela grandes volúmenes de muestra a la vez que proporciona recuperaciones cuantitativas para un gran número de compuestos orgánicos. La SPE se ha seleccionado en muchos casos como método de concentración para la determinación de triclosán o parabenos en aguas residuales y superficiales.

Para la realización de los estudios de halogenación citados anteriormente, nos hemos decantado por esta técnica, no sólo por su versatilidad y sencillez, sino porque permite realizar varias extracciones simultáneas y, a diferencia de la SPME, es posible re-analizar el extracto usando diferentes condiciones cromatográficas. Por tanto, previamente a los estudios de halogenación del triclosán y los parabenos, se llevó a cabo la optimización de las condiciones de extracción en fase sólida. En la tabla III.1 se resumen varias de las metodologías desarrolladas en la bibliografía para la determinación del triclosán y los parabenos.

Tabla III.1. Preparación de muestras acuosas mediante SPE para la determinación de triclosán y parabenos en aguas.

Analitos y matriz	Procedimiento	Detección	LOD (ng/L)	RSD (%)	Rec (%)	Ref.
TCS y otros PPCPs en agua residual y superficial	Filtrar con fibra de vidrio, acidificar a pH 2, concentrar con discos SDB-XC. Eluir con DCM y MeOH. Concentrar a 0.5 mL y derivatizar con BSTFA.	GC-MS	0.2	23	60	(1)(2)
TCS, PBs y otros PPCPs en agua residual	Filtrar 1 L de muestra, ajustar a pH 3. Concentrar con Oasis MAX 150 mg y eluir con MeOH y MeOH con 2 % ácido fórmico. Derivatizar con PFPA y con MTBSTFA.	GC-MS	10	5	87	(3)
TCS y MTCS en agua residual y superficial	Ajustar a pH 2, 200 mL de agua residual ó 1 L de agua superficial. Concentrar con poliestireno-divinilbenceno. Eluir con MeOH:DCM. Etilar con diazoetano y purificar con sílica.	GC-MS	--	--	--	(4)
TCS, fármacos ácidos en agua residual y superficial	Extracción de 50-100 mL de agua a pH 2 con Oasis HLB 60 mg. Elución con 6 mL de MeOH. Adición de ácido meclofenámico, ac. 2,4-diclorobenzoico y fenoprop como patrones internos.	LC-ESI(-)-MS/MS	11-24	5	48	(5)
TCS, AINEs, cafeína en agua residual	Ajustar a pH 7. Concentrar con Oasis HLB 60 mg. Lavar con tampón fosfato pH 7, hexano y eluir 3 mL AcOEt. Derivatizar con BSTFA.	GC-MS	6	4	84	(6)

Analitos y matriz	Procedimiento	Detección	LOD (ng/L)	RSD (%)	Rec (%)	Ref.
TCS, AINEs, cafeína, insecticidas agua residual y mar	Filtrar agua a pH 7, concentrar con Oasis HLB 500 mg. Eluir 5 mL hexano, 5 mL AcOEt y 14 mL MeOH. Concentrar a 0.5 mL y añadir metilcloroformiato para derivatizar.	GC-MS	0.07	15	85	(7)
TCS en agua residual y superficial	Concentrar de 1 L de agua a pH 2, conteniendo ¹³ C ₁₂ -TCS, con Florisil activo. Lavar con 5 mL 5% MeOH en agua y elución con 6 mL AcOEt. Concentrar a 0.2 mL	GC-MS/MS	0.25	14	96	(8)
TCS, AINEs en agua residual	Ajuste de 1 L de agua a pH 6.8 y concentrar con 900 mg C18. Elución con DCM. Derivatizar con anhídrido acético y piridina.	GC-MS	--	--	--	(9)
TCS, PPCPs, AINEs, fármacos agua residual y superficial	Ajuste a pH 2 de 250 mL de agua residual filtrada ó 3 L agua superficial. Concentrar con Oasis HLB 200 mg. Lavado con varios disolventes, elución con acetona. Derivatización con BSTFA.	GC-MS	10	12	93	(10)
TCS, PPCPs y otros DE en agua residual	Extracción de 0.5 L muestra con Oasis HLB 60 mg. Elución con 5 mL MeOH y 5 mL MeOH:MTBE.	LC-ESI(-)-MS/MS	0.34	13	99	(11)
TCS, MTCS, PPCPs en agua de consumo	Extracción de 2-4 L de agua a pH 3 con discos Empore SDB-RPS de PE-DVB, utilizando con surrogado el ácido 2,4-diclofenoxiacético y patrón interno 4,4'-dibromooctafluorobifenol.	GC-MS	110-128	--	--	(12)
TCS, AINEs en agua residual	Extracción de 0.5-1 L de agua con cartuchos C18 de 1 g. Elución con 10 mL de acetona. Derivatización con metilcloroformiato.	GC-MS	50	10	79	(13)
TCS, closanos y MTCS en agua residual	Añadir 20 mL de MeOH a 50-100 mL de agua a pH 2. Concentrar sobre 1 g de C18. Elución con acetato de etilo, tolueno y hexano. Concentración a 0.5 mL, adición de PCB-52 y derivatización con N,N-dietiltrimetilsililamina.	GC-MS	10	21	79	(14)
TCS y otros compuestos clorados en agua residual	Extracción de 50 mL de muestra filtrada con PE-DVB. Lavado con agua ultrapura, secado y elución con 100 µL AcOEt.	GC-AED	200-500	--	--	(15)
900 sustancias, TCS, MeP y EtP en agua residual	Utilizan para ácidos discos de intercambio aniónico, neutros Oasis HLB y C18, y básicos intercambio catiónico. Elución secuencial con varios disolventes. Derivatización de grupos ácidos con Mel.	GC-MS	--	--	--	(16)

AcOEt: acetato de etilo; AINEs: Antiinflamatorios no esteroideos; BSTFA: bis-(trimetilsilil)trifluoroacetamida; DE: disruptores endocrinos; DCM: diclorometano; MeOH: metanol; MTBE: metil-tert-butiléter PE-DVB: poliestireno-divinilbenceno; PFP: anhídrido pentafluoropropiónico; PPCPs: productos de cuidado personal.

Analitos y matriz	Procedimiento	Detección	LOD (ng/L)	RSD (%)	Rec (%)	Ref.
TCS, fármacos en agua residual	Concentración de la muestra de agua con cartuchos Oasis HLB 60 mg. Elución con MeOH y cambio de disolvente a MTBE.	GC-MS	10-20	6	84	(17)
DE, MeP, EtP, PrP, BzP en agua residual	Concentración de 0.5 L de agua con Oasis HLB 200 mg. Elución con 6 mL Propanol:MTBE (1:9). Concentrar a sequedad y redissolver en fase móvil.	LC-MS/MS	0.5-4	5	95	(18)
TCS y triclorocarban en agua superficial	Extracción de 2 L de agua con cartuchos Oasis HLB 60 mg. Elución con 4 mL de acetona:MeOH (1:1), 10 mM de ácido acético. Concentrar a sequedad y reconstituir con 1 mL de MeOH:acetona.	LC-MS	--	--		(19)
TCS en aguas superficiales	Pasar 0.5 L de agua por filtros de celulosa. Ajustar a pH 3 y añadir el surrogado 5-bromo-2-(2,4-dibromofenoxi)fenol. Extraer con Oasis HLB 500 mg y eluir con AcOEt:acetona (1:1). Concentrar a sequedad y diluir con agua:MeOH (1:1).	LC-MS	1	12	82	(20)
TCS y fármacos en agua superficial	Concentración de 500 mL de agua a pH 4 con columnas de C18. Lavado con 20 mL de ACN en agua y elución con la fase móvil.	LC-UV	90	11	102	(21)
DE, MeP, EtP, PrP y BzP en agua residual	Concentración de 50 mL de agua con 200 mg de C18, lavado con agua y elución con 6 mL de DCM:Isopropanol (8:2).	LC-MS	3-11	8	98	(22)

(1) Boyd GR, 2003; (2) Boyd GR, 2004; (3) Lee HB, 2005; (4) Lindstrom A, 2002; (5) Quintana JB, 2004; (6) Thomas PM, 2004; Weigel S, 2004; (8) Wu JL, 2007; (9) Nakada N, 2006; (10) Gibson R, 2007; (11) Vanderford BJ, 2006; (12) Loraine GA, 2006; (13) Paxeus N, 2004; (14) Mc Avoy D, 2002; (15) van Stee LLP, 1999; (16) Eriksson E, 2003; (17) Lee HB, 2003; (18) Benijts T, 2004; (19) Halden RU, 2005; (20) Hua W, 2005; (21) Bones J, 2006; (22) Benijts T, 2003

AcOEt: acetato de etilo; AINEs: Antiinflamatorios no esteroideos; BSTFA: bis-(trimetilsilil)trifluoroacetamida; DE: disruptores endocrinos; DCM: diclorometano; MeOH: metanol; MTBE: metil-tert-butiléter PE-DVB: poliestireno-divinilbenceno; PFPA: anhídrido pentafluoropropiónico; PPCPs: productos de cuidado personal.

De acuerdo con la bibliografía revisada, la elección de los cartuchos Oasis HLB® es la más habitual, ya que este tipo de polímero posee un balance hidrofílico (N-vinilpirrolidona) y lipofílico (divinilbenceno) que proporciona una retención y capacidad superiores frente a otros adsorbentes [<http://www.cienytech.com/ES/pys-dis-ext-oasis.htm>]. La versatilidad de este polímero permite extraer compuestos tanto polares como apolares, lo cual resulta imprescindible en el tipo de estudio que vamos a realizar, donde se prevé la formación de compuestos halogenados con diferentes propiedades físico-químicas y estructuras a priori desconocidas.

3.1.3. Preparación de la muestra para el estudio de halogenación

En los estudios de formación de productos de halogenación se han utilizado muestras de agua ultrapura (100-250 mL). Los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente (temperatura del agua $15 \pm 2^\circ \text{C}$) utilizando botellas de vidrio ámbar de 300 mL. El pH de las muestras fue ajustado con ayuda de tampones fosfato, acetato o bicarbonato (0.1 M) en función del pH requerido (entre 5 y 9 unidades), añadiendo 5 mL de la disolución tampón por cada 100 mL de muestra. Tras el ajuste del pH, se adicionó una cantidad conocida de cloro libre (suma de HClO y ClO^-) así como del compuesto de partida en metanol (el porcentaje de metanol en la muestra fue siempre inferior al 0.1 %). Las muestras se agitaron manualmente durante dos minutos, y se dejaron reaccionar un tiempo determinado. Pasado ese tiempo, se añadieron 10 mg de tiosulfato sódico (reductor) para eliminar el exceso de cloro presente en el medio. Una vez que la reacción fue detenida, el pH de la muestra se ajustó a 2 con HCl 1 M, y se realizó la SPE tal como se ha descrito en el capítulo II, secciones 2.1.1 y 2.1.3.

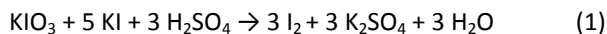
En el caso de las muestras de agua de grifo, se determinó previamente la cantidad de cloro presente en la misma con ayuda de un fotómetro, tal como se indica en el siguiente apartado. A continuación, se procedió del mismo modo que con las muestras de agua ultrapura .

3.1.4. Medida del cloro libre en aguas de grifo

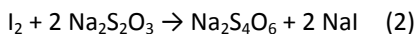
En los estudios realizados con agua de grifo fue necesario determinar la concentración de cloro libre (HClO y ClO^-) presente en la muestra, para lo cual, se utilizó un fotómetro de filtro. La determinación se basa en la reacción que tiene lugar entre el cloro libre y la N,N-dietil-1,4-fenildiamina (DPD) dando lugar a un complejo de color rosado que absorbe a 555 nm. Antes de realizar la medida, se procesó previamente un blanco de agua en ausencia del DPD; la medida de la muestra se hace añadiendo el agente complejante al agua. La concentración de cloro libre es leída directamente, expresada en mg/L (ppm) [Clesceri LS; 1998].

3.1.5. Valoración de la disolución de hipoclorito

Dado que las disoluciones de hipoclorito tienen una estabilidad limitada, es necesario controlar la concentración exacta de cloro libre presente en la misma semanalmente. Para ello, se realizó una valoración redox con tiosulfato sódico. Este compuesto no es patrón primario, con lo cual es necesario estandarizarlo previamente con KIO_3 (patrón primario). En un matraz erlenmeyer se añaden 25 mL de disolución de KIO_3 (0.0200 M), 2 mL de H_2SO_4 3M y 2 g de KI, de modo que se genera I_2 (color pardo rojizo) según la reacción:



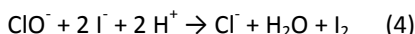
En la bureta tenemos la disolución de tiosulfato sódico, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, aproximadamente 0.1 M, y vamos añadiendo esta disolución hasta que aparece un color amarillo pálido. En ese momento se añaden unas gotas de engrudo de almidón (indicador) de modo que la coloración de la disolución se torna azul, debido al complejo que se forma entre el yodo y el engrudo. Se añade más tiosulfato hasta que la disolución vira a transparente lo que significa que se ha consumido todo el I_2 . La reacción redox se produce entre el yodo y el tiosulfato sódico:



Conociendo el volumen gastado, es posible conocer la concentración real del tiosulfato sódico, según la fórmula:

$$M_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} = 6 \times (M_{\text{KIO}_3} \times V_{\text{KIO}_3}) / V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} \quad (3)$$

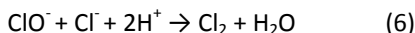
Una vez conocida la concentración exacta del tiosulfato, se realiza la valoración propia de la disolución de hipoclorito. Para ello, se diluye 10 veces la disolución comercial (40 g/L de cloro activo) con agua ultrapura, y se añade 10 mL de la misma a 10 mL de ácido acético 3 M y 2 g KI contenidos en un matraz erlenmeyer. De esta manera se forma I_2 debido a la presencia del hipoclorito según la reacción:



Una vez generado el yodo en el medio, se procede a la valoración tal como se había llevado a cabo para la estandarización del tiosulfato. Considerando la ecuación (2), los moles de yodo generados vienen dados por la expresión:

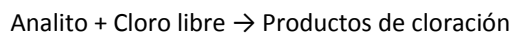
$$\text{moles}_{\text{I}_2} = 1/2 \times (M_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} \times V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}) \quad (5)$$

De acuerdo con la ecuación 4, los moles de hipoclorito (ClO^-) coinciden con los moles de yodo. La concentración de esta especie se puede expresar como cloro activo a través de la reacción:



3.1.6. Cálculo del tiempo de vida media

Los experimentos de degradación del triclosán, metil, etil, propil y butilparaben fueron llevados a cabo usando concentraciones de los mismos en el rango de los ng/mL, mientras que la concentración de cloro se mantuvo a los niveles presentes en las aguas de consumo doméstico (mg/L). La velocidad de reacción del compuesto considerado para dar lugar a los productos de cloración se define según la siguiente ecuación:



$$V = -\frac{\delta[\text{Analito}]}{\delta t} = k'[\text{Analito}]_t^x [\text{Cloro}]_0^y$$

La concentración de cloro libre se mantiene en exceso, de modo que la expresión puede ajustarse del siguiente modo:

$$V = k[\text{Analito}]_t^x$$

siendo $k = k'[\text{Cloro}]_0^y$ la constante aparente de la velocidad de reacción.

Los datos experimentales mostraron que $x=1$, esto es el orden parcial de la reacción respecto al TCS y los parabenos fue la unidad. Por tanto:

$$V = -\frac{\delta[\text{Analito}]}{\delta t} = k[\text{Analito}]_t$$

Reorganizando esta expresión, obtenemos la siguiente integral:

$$\int_0^t \frac{\delta[\text{Analito}]}{[\text{Analito}]_t} = -\int_0^t k \delta t$$

Integrando, llegamos a la siguiente expresión:

$$\text{Ln} \frac{[\text{Analito}]_t}{[\text{Analito}]_0} = -kt$$

El tiempo de vida media ($t_{1/2}$) es el tiempo que tarda en reducirse la concentración inicial a la mitad, por lo tanto, viene dado por:

$$t_{1/2} = \frac{\text{Ln}(0.5)}{-k}$$

Donde k es la pendiente de la recta obtenida al representar $\text{Ln}[\text{Analito}]$ frente al tiempo de reacción.

3.2. Condiciones instrumentales de medida

Para el seguimiento de las reacciones de halogenación de TCS y parabenos fue necesario la utilización de una técnica que nos permita poner de manifiesto la presencia de las distintas especies generadas, así como seguir la disminución en la concentración del analito de partida. Con ayuda de la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas en *full scan*, es posible realizar la separación de las distintas especies así como la identificación de los productos de halogenación en base a dos criterios: comparación de tiempos de retención y espectros de masas con patrones puros, e interpretación de los espectros de masas de los picos cromatográficos correspondientes a especies desconocidas, teniendo en cuenta que sufren la misma reacción de sililación que el analito de partida y que en su mayoría se trata de especies policloradas, polibromadas y combinaciones de

ambas. Las intensidades relativas de los *clusters* de iones de estas especies vienen controlada por las abundancias naturales de los isótopos del bromo (^{79}Br y ^{81}Br , 50.5 % y 49.5 %) y de cloro (^{35}Cl y ^{37}Cl , 75.77 % y 24.23 %). La tabla III.2 recoge las intensidades relativas teóricas para los *clusters* de iones en los espectros de masas de impacto electrónico para especies polihalogenadas.

Tabla III.2. Relación de intensidades en los espectros de masas (EI) para compuestos halogenados.

Cl-Br	X	X+2	X+4	X+6	X+8	X+10
Cl	100	32.5				
Cl ₂	100	65.0	10.6			
Cl ₃	100	97.5	31.7	3.4		
Cl ₄	76.9	100	48.7	10.5	0.9	
Cl ₅	61.5	100	65.0	21.1	3.4	0.2
ClBr	76.6	100	24.4			
Cl ₂ Br	61.4	100	45.6	6.6		
Cl ₃ Br	51.2	100	65.0	17.6	1.7	
ClBr ₂	43.5	100	69.9	13.7		
Cl ₂ Br ₂	38.3	100	89.7	31.9	3.9	
Cl ₃ Br ₂	31.3	92.0	100	49.9	11.6	1.0
ClBr ₃	26.1	85.1	100	48.9	8.0	
Cl ₂ Br ₃	20.4	73.3	100	63.8	18.7	2.0
Br	100	98.0				
Br ₂	51.0	100	49.0			
Br ₃	34.0	100	98.0	32.0		
Br ₄	17.4	68.0	100	65.3	16.0	

En las siguientes tablas se muestran los tiempos de retención, así como los iones de identificación de los compuestos de partida y de los productos de cloración y bromación detectados para TCS y parabenos.

Tabla III.3. Parámetros de identificación (GC-MS) para el triclosán y sus productos de halogenación, así como del metiltriclosán.

Compuesto	Tr (min) ¹	Iones cuantificación (m/z)	Iones identificación (m/z)	Intensidades relativas (%)
2,4-DCF	15.80	219+221	219	100
			221	73
			183	24

Compuesto	Tr (min) ¹	Iones cuantificación (m/z)	Iones identificación (m/z)	Intensidades relativas (%)
<i>2,4,6-TCF</i>	17.43	253+255	253	94
			255	100
			257	37
			217	18
<i>2,3,4-TCF</i>	18.21	253+255	253	90
			255	100
			257	37
<i>Cl-hidroxifenol</i>	20.05	315+317	315	100
			317	35
			302	88
<i>MTCS</i>	21.19	302+304	304	100
			252	53
			254	36
			349	100
<i>diCl-hidroxifenol</i>	21.38	349+351	351	76
			314	30
			316	18
			383	100
<i>triCl-hidroxifenol</i>	22.95	383+385	385	83
			387	32
			291	33
			345	95
<i>TCS</i>	23.28	345+347	347	100
			349	36
			200	28
			379	73
<i>Tetra I</i>	24.67	379+381+383	381	100
			383	54
<i>Tetra II</i>	25.12	379+381+383	379	72
			381	100
<i>Penta</i>	26.76	413+415+417	383	57
			413	52
			415	100
			417	75
			419	27

¹ columna HP5-MS

Tabla III.4. Parámetros de identificación (GC-MS) para MeP, EtP, PrP, BuP y sus productos de halogenación, así como del bencilparaben.

Compuesto	Tr (min) ¹	Iones cuantificación (m/z)	Iones identificación (m/z)	Intensidades relativas (%)
<i>MeP</i>	15.59	209	209	100
			177	56
			195	33
<i>EtP</i>	16.35	223	223	100
			151	35
			195	30
<i>3-ClMeP</i>	17.19	243+245	177	21
			243	100
			245	38
<i>PrP</i>	17.38	237	237	100
			151	50
			195	44
<i>3-ClEtP</i>	17.88	257+259	169	44
			257	100
			259	37
<i>3-BrMeP</i>	18.06	287+289	149	36
			287	93
			289	100
<i>BuP</i>	18.39	251	251	100
			151	151
			169	169
<i>3,5-DClMeP</i>	18.54	277+279	195	195
			277	100
			279	71
<i>3-BrEtP</i>	18.70	301+303	301	94
			303	100
			271	100
<i>3-ClPrP</i>	18.82	271+273	273	37
			271	100
			291	100
<i>3,5-DClEtP</i>	19.17	291+293	293	68
			183	30
			321	68
<i>Cl-BrMeP</i>	19.38	321+323	323	100
			325	27

¹ columna HP5-MS

Compuesto	Tr (min) ¹	Iones cuantificación (m/z)	Iones identificación (m/z)	Intensidades relativas (%)
<i>3-BrPrP</i>	19.60	315+317	315	100
			317	99
			319	18
<i>3-CIBuP</i>	19.76	285+287	285	100
			287	37
<i>Cl-BrEtP</i>	20.01	335+337	335	67
			337	100
			339	29
<i>3,5-DCIPrP</i>	20.06	305+307	305	100
			307	67
			309	15
<i>3,5-DBrMeP</i>	20.21	365+367+369	365	43
			367	100
			369	53
<i>3-BrBuP</i>	20.55	329+331	329	90
			331	100
<i>3,5-DCIBuP</i>	20.99	319+321	319	100
			321	74
			379	52
<i>3,5-DBrEtP</i>	20.79	379+381+383	381	100
			383	53
			349	71
<i>Cl-BrPrP</i>	20.83	349+351	351	100
			353	25
			393	61
<i>3,5-DBrPrP</i>	21.60	393+395+397	395	100
			397	60
			363	70
<i>Cl-BrBuP</i>	21.69	363+365	365	100
			367	30
			91	100
<i>BzP</i>	22.05	285	285	76
			235	24
			407	50
<i>3,5-DBrBuP</i>	22.43	407+409+411	409	100
			411	54

¹ columna HP5-MS

3.3. Extracción en fase sólida con derivatización en medio homogéneo de triclosán y compuestos relacionados

Previamente a los estudios de halogenación del triclosán, se desarrolló un método de extracción mediante SPE con derivatización en medio homogéneo para los compuestos estudiados (triclosán, 2,4-diclorofenol, 2,3,4-triclorofenol y metiltriclosán). La cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS) fue seleccionada como técnica de determinación.

3.3.1. Optimización de las condiciones de derivatización en medio homogéneo y estabilidad de los compuestos sililados

Con el objetivo de optimizar las condiciones de derivatización de triclosán, 2,4-diclorofenol y 2,3,4-triclorofenol se llevó a cabo un diseño factorial completo tipo 2^3 , con dos puntos centrales, para evaluar cuales son los factores que afectan, de modo estadísticamente significativo, a la derivatización. En concreto se estudió la influencia de la temperatura, el tiempo y el volumen de derivatizante (MTBSTFA).

Para realizar este estudio se preparó previamente un *pool* de extractos de agua residual, sin tratar, con una adición de 2 ng/mL de triclosán, 2,3,4-triclorofenol y 2,4-diclorofenol. Para ello, se concentraron 4 muestras de 500 mL, ajustadas a pH 2, utilizando cartuchos Oasis HLB® de 60 mg. Los compuestos fueron extraídos con 2 mL de acetato de etilo, y éstos se combinaron. Para la realización de los diez experimentos del diseño factorial, se utilizaron alícuotas de 0.5 mL de este *pool* y el volumen correspondiente de derivatizante. En todos ellos, el volumen final se ajustó a 700 μ L con acetato de etilo. Se inyectó 1 μ L del extracto en el sistema GC-MS y los resultados obtenidos se trataron en el programa estadístico Statgraphics 5.1, obteniendo el valor de los efectos estandarizados, los cuales se muestran junto con las condiciones experimentales en la siguiente tabla (tabla III.5). Como se puede observar, ningún factor fue estadísticamente significativo para los tres compuestos. Cabe destacar que las desviaciones estándar relativas de las áreas de pico para los 10 experimentos del diseño fueron inferiores al 5 %. En base a estos resultados se seleccionó el volumen inferior de derivatizante (20 μ L), un tiempo de reacción mínimo (5 minutos) y temperatura ambiente, simplificando así el proceso de derivatización.

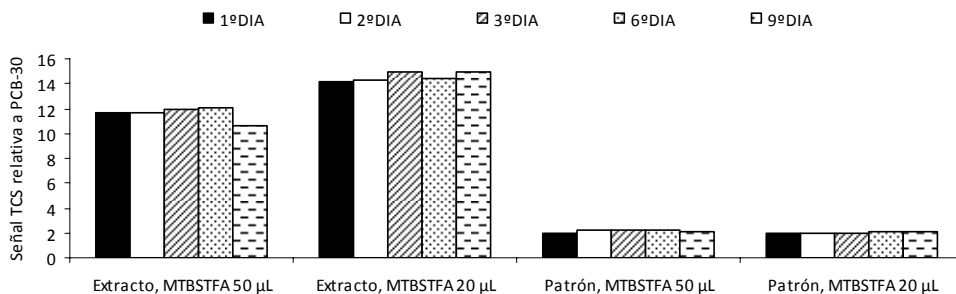
Tabla III.5. Dominio experimental y efectos principales e interacciones estandarizados obtenidos para la optimización de las condiciones de derivatización del triclosán y compuestos relacionados.

Dominio experimental			Efectos principales e interacciones		
Factor	Rango de valores		2,4-DCF	2,3,4-TCF	TCS
A: V. MTBSTFA (μL)	20	200	-1.35	-0.72	-0.72
B: Tiempo (min)	5	60	-1.33	-1.88	-1.28
C: Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	20	70	0.07	0.53	0.77
AB			-0.05	0.49	-0.59
AC			-0.84	-1.09	-0.85
BC			-0.48	0.18	$9 \cdot 10^{-4}$

t=3.20 para n=3 y un 95 %

Se estudio también la estabilidad de los compuestos sililados en el tiempo, puesto que podrían ser susceptibles de sufrir la hidrólisis del enlace Si-O. Para ello, se prepararon dos patrones en acetato de etilo de concentración aproximada 200 ng/mL para cada compuesto, así como dos extractos de 500 μL de una muestra de agua residual, de concentración en torno a 800 ng/mL. Se derivatizaron con 20 y 50 μL de MTBSTFA en ambos casos, y 1 μL de cada uno fue inyectado en el sistema GC-MS, en días sucesivos tras su preparación. Para evitar la concentración de los extractos, estos fueron almacenados a 4 $^{\circ}\text{C}$ entre inyecciones. Los resultados obtenidos para el triclosán se muestran en el gráfico adjunto, en donde podemos ver su señal relativa frente al PCB-30, utilizado como patrón interno para minimizar las variaciones en la respuesta del sistema de GC-MS durante el estudio.

Figura III.1. Estabilidad temporal del triclosán sililado para un patrón (200 ng/mL) y un extracto de agua (800 ng/mL) usando distintos volúmenes de derivatizante.



Como se puede observar en la figura III.1, el compuesto derivatizado resultó ser estable al menos durante 9 días tras el proceso de sililación, lo que implica la posibilidad de almacenar extractos y patrones de calibración tras su preparación para su re-inyección en caso necesario. El 2,4-diclorofenol y el 2,3,4-triclorofenol mostraron un perfil similar al del triclosán en lo referente a la estabilidad temporal de sus derivados sililados.

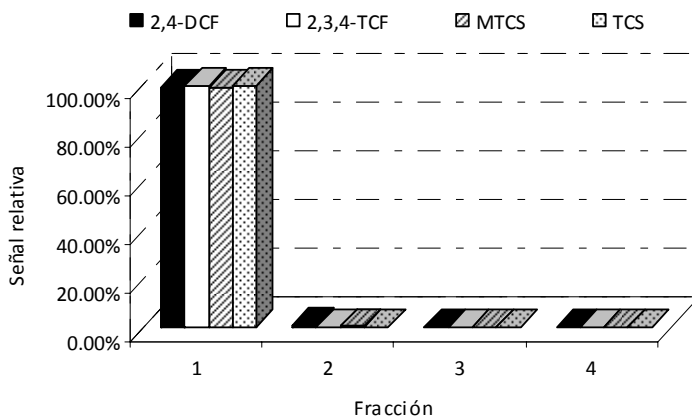
3.3.2. Optimización del proceso de SPE para muestras acuosas

Una vez fijadas las condiciones de derivatización, se procedió a la optimización de un método de SPE para la determinación de los compuestos anteriores, además del metiltriclosán, en muestras acuosas. En primer lugar, se estudió el volumen de elución y el volumen máximo de muestra a concentrar con los cartuchos de N-vinilpirrolidona y divinilbenceno. A continuación, se consideró la posibilidad de purificar los extractos correspondientes a agua residual para la posterior aplicación del método al análisis de muestras reales, así como a los estudios de halogenación del triclosán.

3.3.2.1. Volumen de elución y volumen de corte

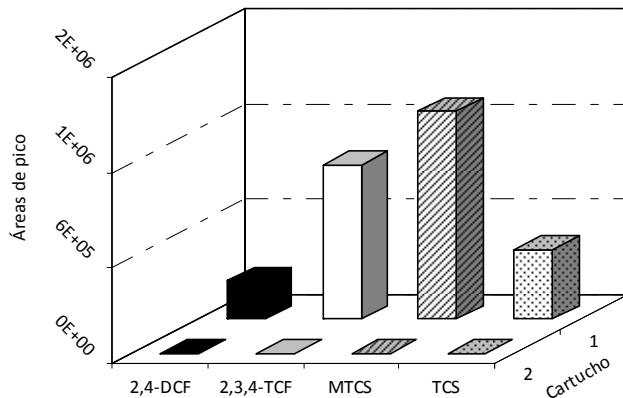
La extracción de los compuestos estudiados se llevó a cabo empleando los cartuchos Oasis HLB® de 60 mg. La elección de acetato de etilo como disolvente de elución en lugar de metanol, tal como indica el protocolo genérico de preparación de muestra, se hizo en base a estudios previos realizados con estrógenos por Rodríguez y colaboradores [Rodríguez I; 2003]. La recuperación de los analitos con acetato de etilo permitió la derivatización directa del extracto obtenido sin necesidad de un cambio de disolvente, ya que el metanol reaccionaría con el agente sililante. Para evaluar el volumen de disolvente necesario para recuperar los compuestos, se hizo pasar 1 L agua ultrapura, con adición de los analitos a nivel de 4 ng/mL a través de un cartucho Oasis HLB® de 60 mg, procediendo al secado del mismo y la elución de 4 fracciones de acetato de etilo de 2 mL cada una. Tras la etapa de derivatización, se inyectó 1 µL del extracto en el sistema GC-MS. Los resultados obtenidos mostraron que los compuestos son eluidos cuantitativamente con 2 mL de acetato de etilo, figura III.2.

Figura III.2. Elución de un cartucho Oasis HLB de 60 mg con fracciones consecutivas de 2 mL de acetato de etilo.



El volumen de ruptura del cartucho de 60 mg, se estudió haciendo pasar 2 L de agua ultrapura, con adición de los compuestos del orden de 4 ng/mL, a través de dos cartuchos conectados en serie, para que el segundo cartucho retenga las posibles pérdidas que pueda sufrir el primero. Los resultados obtenidos mostraron que el volumen de corte del cartucho es superior a 2 L, puesto que los compuestos no fueron detectados en el extracto procedente del segundo cartucho, figura III.3.

Figura III.3. Señales (áreas de pico) correspondientes a la evaluación del volumen de corte de los cartuchos Oasis HLB de 60 mg empleando 2 L de muestra.

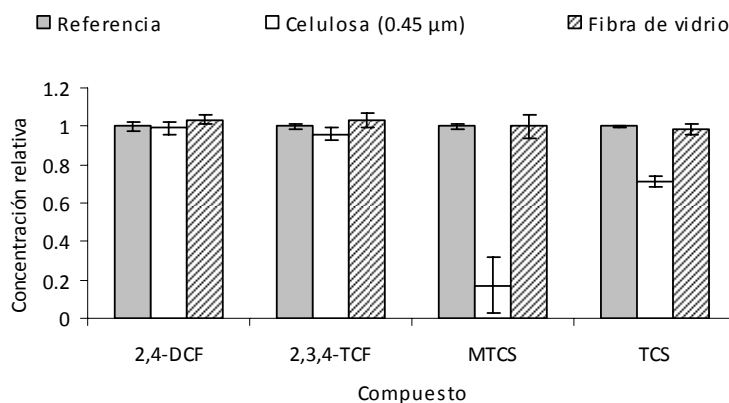


3.3.2.2. Matrices complejas: filtración y purificación de extractos

Las matrices reales (agua de río, agua residual) contienen materia particulada, macromoléculas y compuestos orgánicos que pueden obturar el cartucho de extracción, así como interferir en la determinación de los compuestos de interés. Para evitar ambos problemas, se estudió la viabilidad de realizar la filtración, previa a la SPE, de la muestra de agua para eliminar la materia particulada, evitando la obturación de los cartuchos, así como la posterior purificación del extracto en acetato de etilo con cartuchos comerciales de sílica.

Con respecto a la filtración, se ha tenido en cuenta que muchos compuestos sufren retención en la superficie de los filtros. Singer y colaboradores [Singer H; 2002] indicaron que el triclosán era retenido por los filtros de poliamida, a diferencia de los filtros de celulosa regenerada. Los filtros considerados fueron de membrana de acetato-nitrato de celulosa de 0.45 μm y de fibra de vidrio de 1 μm de tamaño de poro. En ambos casos, se filtraron muestras de agua ultrapura (pH 2) conteniendo los cuatro analitos a nivel de 25 ng/mL. Posteriormente se concentraron mediante SPE. También se procesó una referencia sin filtrar para poner de manifiesto el nivel de retención de los compuestos sobre los filtros. Los resultados obtenidos se muestran en la figura III.4.

Figura III.4. Evaluación de la retención de los analitos en distintos filtros. Señal relativa a la referencia no filtrada (N=3).



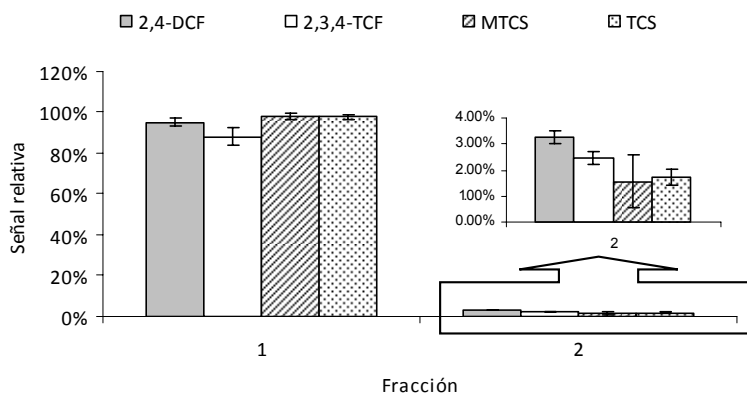
El triclosán y especialmente el metiltriclosán, mostraron una adsorción importante en los filtros de acetato-nitrato de celulosa, siendo más acusada cuanto mayor es su constante de partición

octanol-agua (4.8 y 5.4, respectivamente). En base a estos resultados, se decidió utilizar filtros de fibra de vidrio.

Con respecto a los extractos procedentes de aguas residuales, se consideró la posibilidad de llevar a cabo su purificación con cartuchos comerciales de sílica neutra de 500 mg (Sep-Pak® 500 mg/3 mL). Este tipo de adsorbente retiene moléculas de naturaleza polar, las cuales pueden acortar la vida útil de la columna, además de consumir parcialmente el derivatizante añadido a los extractos.

El primer paso fue evaluar la cantidad de disolvente necesario para eluir cuantitativamente los compuestos del adsorbente en fase normal. Para ello, se cargaron 2 mL de un patrón en acetato de etilo (2 µg/mL) sobre un cartucho de sílica, recogiendo fracciones de acetato de etilo, la primera de ellas de 5 mL y las sucesivas de 2 mL. La primera fracción fue concentrada a 2 mL, y posteriormente derivatizada junto con las otras tres. Los resultados obtenidos se muestran en la figura III.5.

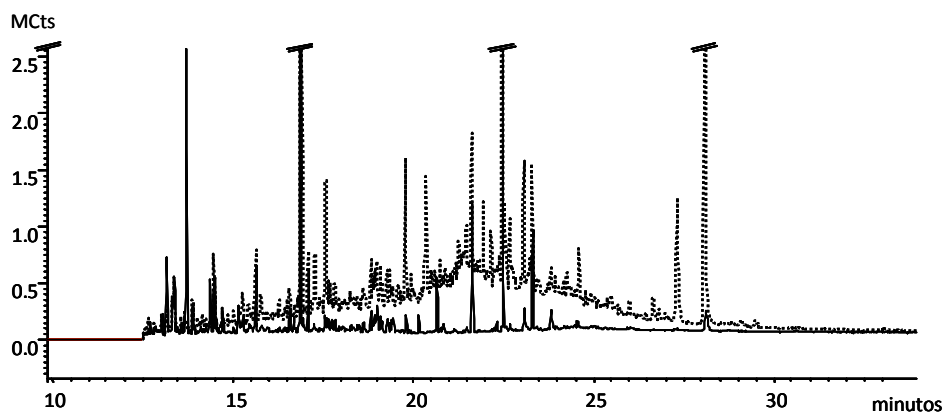
Figura III.5. Perfil de elución de los analitos en los cartuchos de sílica de 500 mg (N=3).



Como se puede comprobar, 5 mL de acetato de etilo fueron suficientes para la elución de los compuestos del cartucho de sílica.

En la figura III.6 se muestran los cromatogramas de GC-MS (corriente iónica total) correspondientes al extracto de una muestra de 1 L de agua residual, con y sin etapa de limpieza sobre sílica. La reducción de la complejidad del cromatograma es evidente, figura III.6, no sólo desde el punto de vista de la señal cromatográfica, sino que la reducción de la coloración del extracto fue también importante.

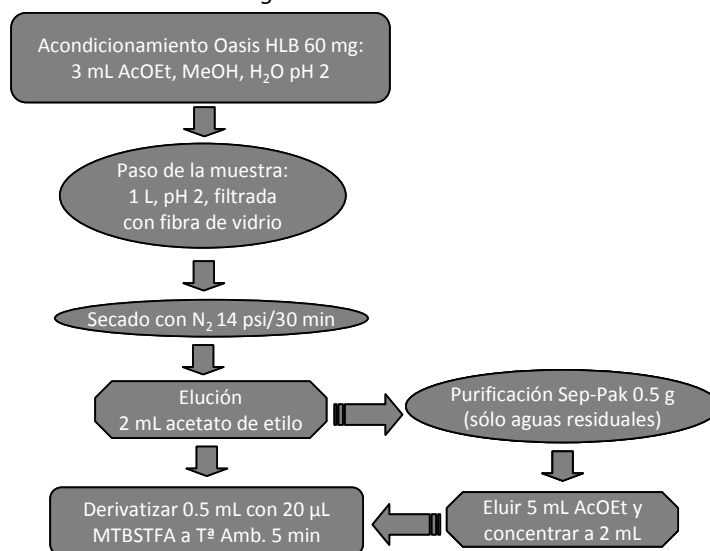
Figura III.6. Superposición de cromatogramas (GC-MS) para un agua residual con limpieza (línea continua) y sin limpieza (línea discontinua).



3.3.3. Caracterización del método analítico

Una vez optimizadas las condiciones de concentración de los analitos, mediante extracción en fase sólida, con derivatización en medio homogéneo y análisis mediante GC-MS, figura III.7, se caracterizó tanto el método de determinación como el proceso analítico en su conjunto.

Figura III.7. Esquema del proceso de preparación de muestra mediante SPE para la determinación de triclosán y compuestos relacionados en agua.



3.3.3.1. Caracterización del método de determinación (GC-MS): linealidad, repetibilidad y límites de cuantificación

La linealidad de la respuesta analítica se evaluó mediante un calibrado a 10 niveles de concentración comprendidos entre 25 ng/mL y 3 µg/mL. Las regresiones obtenidas al representar el valor de área de pico frente a la concentración de los analitos, mostraron coeficientes de determinación de 0.999.

La repetibilidad de inyección fue estudiada inyectando 1 µL de un patrón de 400 ng/mL por quintuplicado. Los coeficientes de variación obtenidos para cada uno de los compuestos se indican en la tabla III.6, siendo inferiores en todos los casos a 2.5 %.

Los límites de cuantificación (LOQs) se definen como la cantidad mínima de compuesto que produce una señal cromatográfica con una relación S/N de 10, cuando se registran los cromatogramas a las relaciones de m/z del pico base del espectro de masas del compuesto. Los LOQ del equipo (GC-MS) para los cuatro analitos estudiados se evaluaron inyectando niveles de concentración inferiores a 5 ng/mL. Con ayuda del software GC-MS Saturn Workstation 5.4 se calcularon los límites de cuantificación para los compuestos. Este software integra la señal de área (ruido) de los 5 scans obtenidos previa y posteriormente al pico cromatográfico para dar lugar a los límites de cuantificación, tabla III.6.

Tabla III.6. Ecuaciones de las rectas de calibrado, coeficientes de determinación, LOQs y repetibilidad para los analitos estudiados.

	Recta	R ²	LOQ (ng/mL)	Repetibilidad (% RSD, n=5)
2,4-DCF	Y=1091X+16070	0.999	4	1.2
2,3,4-TCF	Y=857X+11349	0.999	3	1.4
MTCS	Y=784X+1315	0.999	2	2.4
TCS	Y=1164X+25057	0.999	3	1.0

3.3.3.2. Exactitud, precisión y límites de cuantificación del método analítico

Los límites de cuantificación (LOQs) se definen como la cantidad mínima de analito que puede ser cuantificado con fiabilidad, correspondiente a una relación S/N de 10. En base a esta definición y teniendo en cuenta el factor de concentración obtenido, así como los blancos de proceso, se establecieron los siguientes LOQs para un volumen de muestra de 1 L, tabla III.7. Los

LOQs obtenidos con la metodología de SPE desarrollada son 2 veces superiores a los obtenidos por SPME, tabla I.10.

Tabla III.7. Límites de cuantificación del método de SPE (Vol. 1 L).

Compuesto	LOQ (ng/L)
2,4-DCF	8
2,3,4-TCF	6
MTCS	4
TCS	6

La exactitud y precisión del método desarrollado se evaluaron para cada uno de los compuestos en distintas matrices acuosas. Para realizar este estudio, se ha utilizado 1 L de agua con adición de los analitos a nivel de 0.5 ng/mL, realizando 4 réplicas del proceso analítico para cada tipo de muestra. En el caso del efluente (agua residual tratada), se compararon las recuperaciones y los coeficientes de variación obtenidos con y sin etapa de purificación. Las recuperaciones se determinaron mediante un calibrado externo, con patrones en acetato de etilo de distintas concentraciones, teniendo en cuenta las señales obtenidas para las muestras sin adición. Las recuperaciones obtenidas oscilaron entre 77 y 116 %, con RSDs inferiores al 10 %, prácticamente para la mayoría de las muestras, tabla III.8.

Tabla III.8. Recuperaciones (%) del método para 1 L de muestra con adición de los compuestos a nivel de 0.5 ng/mL (N=4).

Matriz	2,4-DCF	2,3,4-TCF	MTCS	TCS
Agua Milli-Q	94±5	95±4	95±3	98±3
Agua río	108±3	105±4	103±11	88±7
Res. tratada sin limpieza	112±4	106±4	116±4	114±3
Res. tratada con limpieza	92±4	77±5	110±4	102±6
Res. sin tratar con limpieza	90±3	89±3	108±2	98±5

3.4. Extracción en fase sólida con derivatización en medio homogéneo para la determinación de parabenos en muestras de agua

Para la determinación de parabenos en muestras de agua se optimizó también un método de extracción en fase sólida. Esta metodología fue aplicada al análisis de muestras de agua de río y agua residual, así como para seguir los estudios de halogenación a los cuales nos referiremos más adelante.

3.4.1. Optimización de las condiciones de derivatización en medio homogéneo y estabilidad de los compuestos sililados

Las condiciones de derivatización en medio homogéneo de los parabenos en lo referente a volumen de derivatizante (20-100 μL), tiempo (5-60 minutos) y temperatura (20-70°C), fueron estudiados mediante un diseño experimental factorial fraccional en modo mixto 3×2^2 con un punto central. Este tipo de diseño permite estudiar uno de los factores a 3 niveles (en nuestro caso la temperatura), estimando así el término cuadrático asociado al mismo.

Para llevar a cabo los distintos experimentos se preparó un *pool* de extractos, en acetato de etilo, correspondientes a agua residual tratada a la que se adicionó los parabenos a nivel de 700 ng/mL. Una vez obtenido este *pool*, se añadió a 500 μL de extracto el volumen de derivatizante indicado en la tabla III.9, diluyendo con acetato de etilo hasta un volumen final de 600 μL en caso necesario. Los extractos fueron inyectados en el sistema GC-MS obteniendo las áreas de pico que se muestran en la tabla III.9.

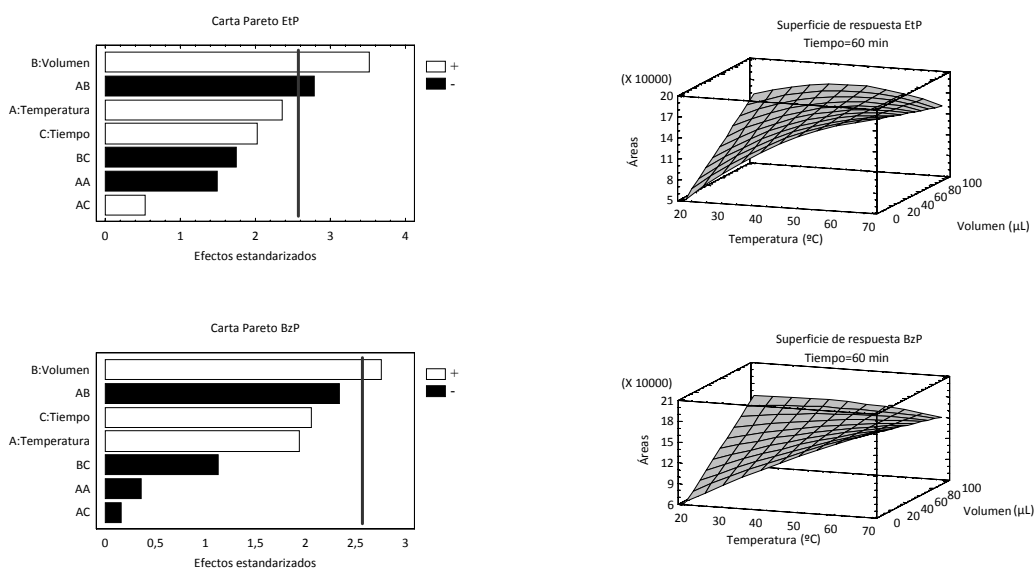
Tabla III.9. Experimentos realizados y áreas de pico obtenidas durante la optimización de la derivatización en medio homogéneo.

Temperatura (°C)	V. MTBSTFA (μL)	Tiempo (min)	MeP	EtP	PrP	BuP	BzP
45	100	5	178940	156294	152202	225023	135059
70	100	5	162922	145024	147815	200001	140083
70	20	60	173866	164183	158159	222404	155725
20	20	5	39231	39959	38311	51694	39612
45	100	60	184084	170689	151894	238164	175905
45	20	5	56168	55400	57169	72217	33142
70	20	5	137631	119913	120735	174833	143094
20	20	60	50095	50644	39134	75725	70025
45	60	32.5	166651	166589	158907	224407	150386

Temperatura (°C)	V. MTBSTFA (µL)	Tiempo (min)	MeP	EtP	PrP	BuP	BzP
70	100	60	168919	147106	156030	209399	147308
45	20	60	194579	173437	165120	240398	162801
20	100	60	172321	152592	157493	213701	153918
20	100	5	171392	155645	157094	215901	151517

Tras el tratamiento de los resultados obtenidos (áreas de pico) con el programa estadístico Statgraphics 5.1, se obtuvieron las cartas Pareto para los 5 compuestos estudiados, y las correspondientes superficies de respuesta. MeP, EtP, PrP y BuP presentaron cartas Pareto y superficies de respuesta similares. El BzP difiere ligeramente, aunque las conclusiones a las que se llegaron fueron las mismas, figura III.8.

Figura III.8. Cartas Pareto y superficies de respuesta para el etilparaben y el bencilparaben.

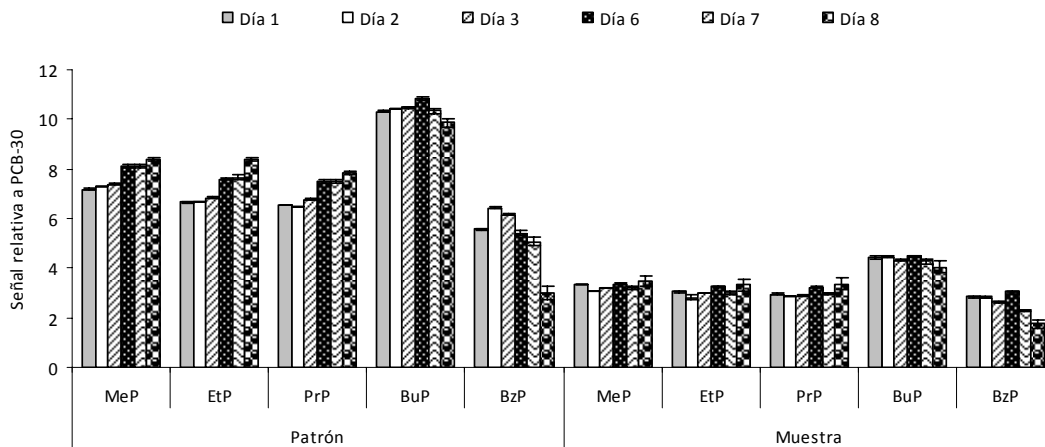


En las cartas Pareto se puede observar que valores altos de temperatura, tiempo y volumen de MTBSTFA afectaron de modo positivo a la eficacia de derivatización. Incluso para MeP, EtP, PrP y BuP el volumen de derivatizante fue estadísticamente significativo (95% confianza), así como la interacción temperatura-volumen (AB). Las superficies de respuestas obtenidas para 60 minutos, mostraron que a temperaturas elevadas, la señal resultó ser mucho mayor frente a temperatura ambiente. Con respecto al derivatizante, para obtener mejores resultados se requieren volúmenes

mayores de MTBSTFA, aunque a temperaturas elevadas, se observó que la respuesta prácticamente no variaba con el volumen de derivatizante, con lo cual, se seleccionó un valor medio (40 μL de MTBSTFA) dentro del dominio explorado en el diseño.

Una vez fijadas las condiciones de derivatización (40 μL de MTBSTFA a 70°C durante 60 minutos) se evaluó la estabilidad de los compuestos derivatizados en el tiempo. Para ello, se preparó un patrón en acetato de etilo de 1.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y un extracto de un efluente con adición de los analitos a nivel de 500 ng/mL . Quinientos microlitros de las disoluciones anteriores fueron derivatizados con 40 μL de MTBSTFA a 70°C durante una hora, inyectando posteriormente 1 μL en el sistema GC-MS durante varios días. Al igual que en el caso del triclosán, se utilizó como patrón interno el PCB-30 para compensar los posibles cambios de respuesta que puede haber en el equipo. Los resultados obtenidos, mostraron que los parabenos derivatizados son estables durante un periodo de 7 días cuando son almacenados a 4°C, figura III.9.

Figura III.9. Estabilidad de los compuestos sililados en el tiempo. Señal relativa al PCB-30.



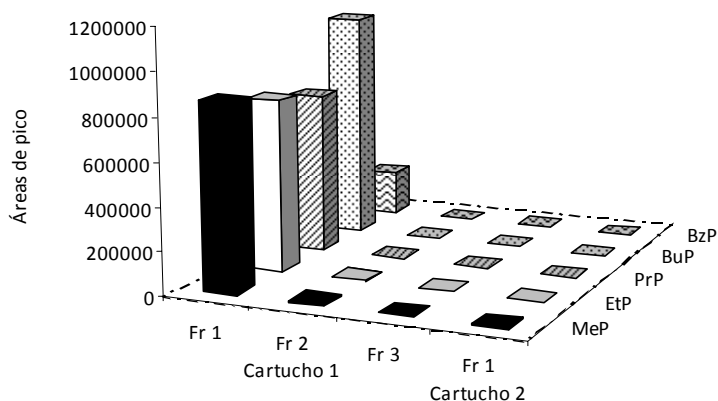
3.4.2. Optimización del proceso de SPE para muestras acuosas

Una vez fijadas las condiciones óptimas de derivatización, los parámetros de extracción de los parabenos en muestras de agua fueron optimizados usando el mismo adsorbente que para el triclosán. Las condiciones de partida fueron las mismas: agua a pH 2.5, cartuchos Oasis HLB® de 60 mg y acetato de etilo como eluyente.

3.4.2.1. Volumen de elución de los cartuchos y volumen de corte

La cantidad de acetato de etilo necesaria para recuperar los compuestos del cartucho de SPE, así como el volumen máximo de muestra a concentrar con la fase polimérica seleccionada fueron evaluados simultáneamente. Para ello se concentró una muestra de agua ultrapura de 2 L a pH 2.5 con un nivel de adición de 2 ng/mL. Esta muestra se hizo pasar por dos cartuchos conectados en serie, de modo que en el caso de que el volumen de corte sea menor, el eluato del segundo cartucho presentará señal para los compuestos estudiados. Por otra parte, el primer cartucho fue eluido con 3 fracciones de acetato de etilo (2 mL cada una) para establecer el volumen mínimo de disolvente necesario para recuperar cuantitativamente los compuestos. Los resultados obtenidos se muestran en la figura III.10.

Figura III.10. Volumen de ruptura y de elución de los parabenes usando cartuchos Oasis HLB® de 60 mg.



Como se puede observar en la figura III.10, 2 mL de acetato de etilo fueron suficientes para eluir conjuntamente los cinco compuestos. Por otra parte, el volumen de corte del cartucho resultó ser superior a 2 L de muestra, puesto que no hay presencia de los parabenes en el segundo cartucho.

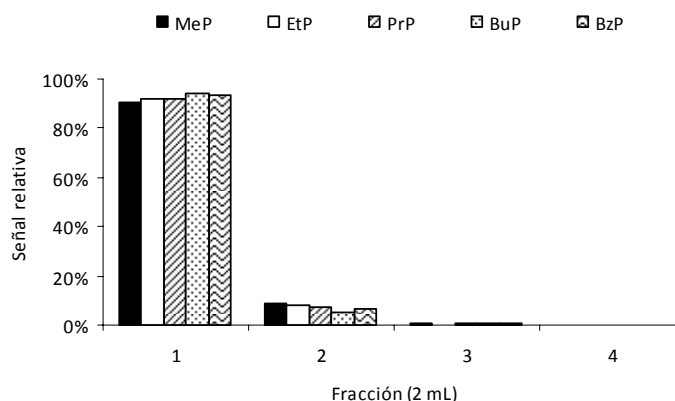
3.4.2.2. Matrices complejas: Purificación de los extractos

Los extractos procedentes de aguas residuales presentaron una gran complejidad debido a la presencia de sustancias co-extraídas. Del mismo modo que se ha hecho para el triclosán, se

planteó una estrategia de purificación de los extractos procedentes de los cartuchos de fase reversa, utilizando cartuchos de sílica neutra comerciales, Sep Pak® de 500 mg.

Fue necesario conocer el volumen de acetato de etilo necesario para recuperar los compuestos de los cartuchos de fase normal. Para ello, se depositó sobre este cartucho una alícuota de un patrón de los analitos con una concentración de 2 µg/mL. Se recogieron fracciones sucesivas de 2 mL de acetato de etilo, que, una vez derivatizadas, fueron inyectados en el sistema GC-MS. Las áreas de pico obtenidas se representaron en la siguiente figura, figura III.11.

Figura III.11. Perfil de elución para los parabenos de los cartuchos de sílica Sep-Pak® de 500 mg con acetato de etilo.

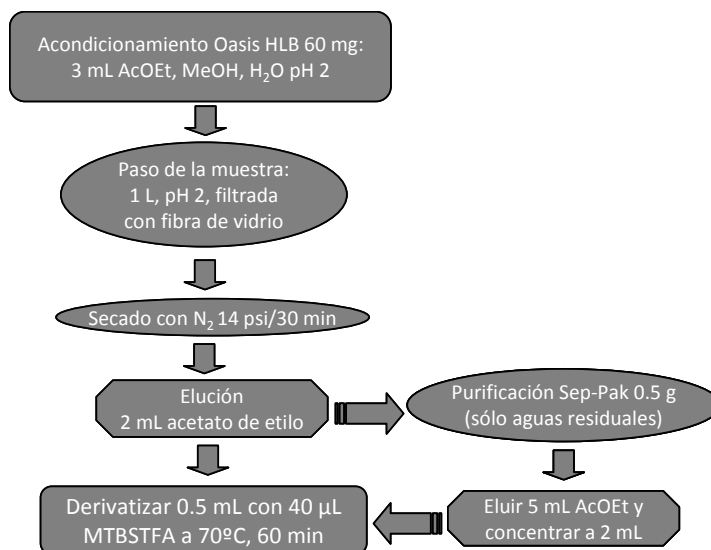


En la figura anterior se puede apreciar que son necesarios, al menos, 4 mL de acetato de etilo para recuperar cuantitativamente los parabenos de los cartuchos de sílica. Por lo tanto, la purificación de los extractos de aguas residuales se realizará pasando a través del cartucho de sílica los 2 mL de acetato de etilo eluidos del cartucho Oasis HLB y recuperando los compuestos con 5 mL del mismo disolvente. A continuación, esos 5 mL serán concentrados en corriente de nitrógeno hasta un volumen de 2 mL para proceder a su derivatización y determinación cromatográfica.

3.4.3. Caracterización del método analítico

Una vez optimizadas las condiciones de extracción de las muestras de agua conteniendo parabenos, figura III.12, se presentan las características del método de determinación (GC-MS) en lo referente a exactitud, precisión y límites de cuantificación.

Figura III.12. Esquema de preparación de muestra mediante SPE para la determinación de parabenos en agua.



3.4.3.1. Caracterización del método de determinación (GC-MS): linealidad, repetibilidad y límites de cuantificación instrumentales

La linealidad del sistema GC-MS para parabenos fue estudiada inyectando una serie de patrones cuyas concentraciones estaban comprendidas entre 20 ng/mL y 2 µg/mL. Los coeficientes de determinación de las rectas obtenidas oscilaron entre 0.997-0.998.

Para la obtención de los LOQs del equipo se procedió de forma idéntica que en el estudio realizado con el triclosán. La repetibilidad de inyección se evaluó con un patrón de concentración 100 ng/mL para cada analito, inyectado seis veces en el sistema cromatográfico. Los parámetros que caracterizan al sistema GC-MS se muestran en la siguiente tabla (tabla III.10).

Tabla III.10. Rectas de calibrado, coeficientes de determinación, LOQs y repetibilidad para parabenos utilizando GC-MS como técnica de determinación.

	Recta	R ²	LOQ (ng/mL)	Repetibilidad (% RSD, n=6)
MeP	Y=306X+6812	0.998	5	6.1
EtP	Y=274X+6361	0.998	5	4.1

	Recta	R ²	LOQ (ng/mL)	Repetibilidad (% RSD, n=6)
PrP	Y=264X+6597	0.998	3	4.6
BuP	Y=405X-5289	0.998	2	7.1
BzP	Y=256X-10705	0.997	13	8.3

3.4.3.2. Exactitud, precisión y límites de cuantificación del método analítico

Los límites de cuantificación para los parabenos en muestras acuosas se obtuvieron considerando los blancos del proceso así como los LOQs proporcionados por el sistema de detección (GC-MS), considerando un factor de concentración de 500 veces (1 L a 2 mL de acetato de etilo), tabla III.11. En el caso de matrices sencillas (aguas superficiales), estos LOQs se podrán reducir incrementando el volumen de muestra hasta 2 L. Para aguas residuales no es posible concentrar volúmenes superiores a 1 L debido a la obturación del adsorbente en el cartucho de SPE.

Tabla III.11. Límites de cuantificación del método de SPE (Vol. 1000 mL).

LOQ	MeP	EtP	PrP	BuP	BzP
ng/L	10	10	6	3	26

Los LOQs obtenidos utilizando SPE como técnica de concentración fueron similares que los obtenidos para SPME (tabla II.7) con excepción del MeP para el que no se detectaron señales en los blancos de SPE.

La exactitud y precisión del método analítico fueron evaluadas con un conjunto de muestras de agua ultrapura, agua de grifo (tratada previamente con tiosulfato sódico para eliminar el cloro presente en la misma), agua de río, agua residual tratada y sin tratar. Para ello, se procesaron por cuadruplicado 1 litro de cada tipo de muestra con adición de los parabenos a nivel de 0.5 ng/mL. Las concentraciones en muestra fueron cuantificadas mediante calibrado externo, sustrayendo la señal de las fracciones sin adición en el caso de las muestras de agua de río y residual. Las recuperaciones obtenidas se muestran en la tabla III.12. Los extractos correspondientes a muestras de agua residual fueron purificadas con 500 mg de sílica, tal como se ha descrito en el apartado 3.4.2.2. de este capítulo.

Tabla III.12. Recuperaciones (%) del método para 1 L de muestra con adición de los compuestos a nivel de 0.5 ng/mL (N=4).

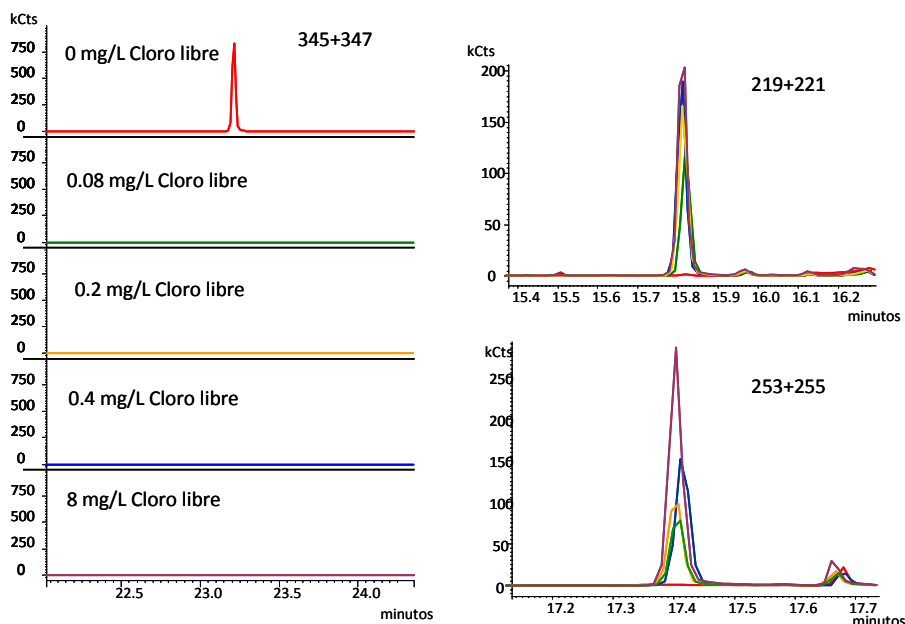
Matriz	MeP	EtP	PrP	BuP	BzP
<i>Agua Milli Q</i>	106±2	109±3	112±1	107±1	99±9
<i>Agua de grifo</i>	80±5	94±3	98±4	97±3	81±2
<i>Agua de río</i>	107±5	104±5	112±2	110±2	88±5
<i>Res. tratada</i>	105±4	112±4	119±5	108±2	108±4
<i>Res. sin tratar</i>	79±6	91±6	96±4	103±1	118±2

3.5. Halogenación del triclosán

3.5.1. Pruebas preliminares

El triclosán es un fenoxifenol triclorado que, dada a su estructura, es susceptible de sufrir reacciones de halogenación en el anillo fenólico cuando se pone en contacto con electrófilos como el hipoclorito sódico. Inicialmente, se llevaron a cabo una serie de experimentos con objeto de confirmar esta hipótesis. Se emplearon alícuotas de agua ultrapura con una cantidad conocida de triclosán, 40 ng/mL, y concentraciones variables de cloro libre (0.08, 0.2, 0.4 y 8 mg/L). Todas estas pruebas se realizaron a temperatura ambiente (temperatura del agua $15 \pm 2^\circ\text{C}$), en ausencia de luz y sin ajuste del pH del medio, seleccionando un tiempo de reacción de 1 hora. Tras ese tiempo, se concentraron las muestras aplicando la metodología de SPE y se inyectaron en el sistema GC-MS, obteniendo los correspondientes cromatogramas, figura III.13.

Figura III.13. Cromatogramas de GC-MS obtenidos en los estudios previos de cloración del triclosán.



Como se puede comprobar, tras una hora, el triclosán reaccionó cuantitativamente con el agente oxidante a las cuatro concentraciones evaluadas. Por otra parte, resultó significativa la formación de 2,4-diclorofenol, así como de un triclorofenol, a 17.4 minutos, que no se corresponde

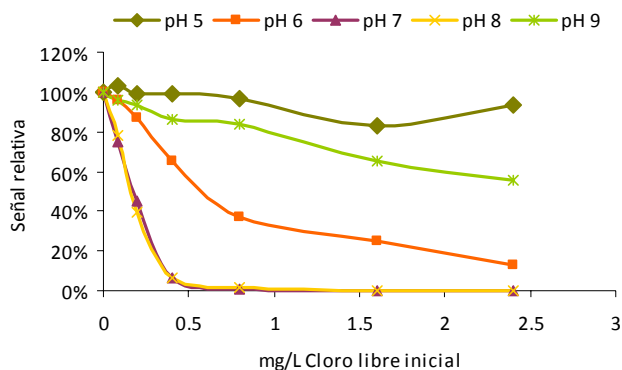
con el 2,3,4-triclorofenol (t_r 18.2 minutos). La señal de estos últimos aumentó con la cantidad de cloro en el medio de reacción.

Tal como se aprecia en estas pruebas iniciales, el triclosán es susceptible de sufrir una degradación relativamente rápida en presencia de niveles bajos de cloro libre, formándose varios subproductos durante este proceso. Por tanto, se procedió al estudio sistemático de aquellos factores que influyen en la reactividad del triclosán en presencia de cloro libre.

3.5.2. Estudio de degradación a distintos pHs y concentraciones de cloro libre

La influencia del pH y de la concentración de cloro libre en la degradación de triclosán fue investigada utilizando alícuotas de 100 mL de agua ultrapura, tamponada a cinco pHs diferentes, comprendidos entre 5 y 9, y con concentraciones de cloro libre crecientes, de 0 a 2.4 mg/L. Tras la adición de triclosán, la mezcla se dejó reaccionar durante 5 minutos en botellas cerradas y en ausencia de luz. Pasado ese tiempo, se eliminó el exceso de agente oxidante con 10 mg de tiosulfato sódico (reductor) y se procedió a la concentración de las muestras mediante la metodología de SPE desarrollada en este capítulo. En la figura III.14, se puede observar la estabilidad del triclosán frente a las distintas concentraciones de cloro y el pH del agua.

Figura III.14. Estabilidad relativa del triclosán a distintos pHs y concentraciones iniciales de cloro libre. Concentración inicial de TCS 50 ng/mL.



En la figura III.14 se puede apreciar un aumento de la degradación del triclosán con la concentración de agente oxidante. Además, el pH ejerció un efecto notable en su estabilidad, observándose la máxima reactividad en el intervalo entre pH 7 y 8, lo cual concuerda con la información existente para especies fenólicas. En general, este tipo de reacciones son más favorables cuando el compuesto se encuentra en forma fenolato, mientras que el oxidante (pK_a 7.5)

se encuentra en su forma ácida. En el caso del triclosán, pK_a de 7.80, el rango entre pH 7 y 8 resultó ser el más favorable para su degradación.

3.5.3. Cinéticas de cloración en agua ultrapura

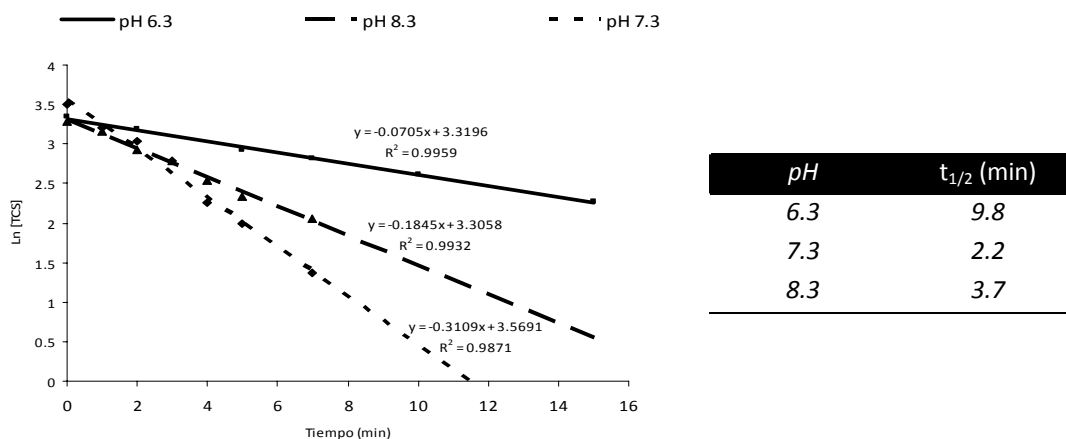
La cinética de cloración del triclosán en agua ultrapura fue estudiada a tres pHs diferentes (6.3, 7.3 y 8.3) a los que pueden encontrarse las aguas superficiales. La concentración de cloro libre se mantuvo en 0.4 mg/L, concentración media estipulada para el agua de grifo. Cabe destacar que el cloro libre está en exceso frente al triclosán (9 ng/mL), por tanto, la velocidad de reacción es función únicamente de la concentración de triclosán presente en el medio. Puesto que la representación del logaritmo neperiano de la concentración de triclosán frente al tiempo de reacción responde a una línea recta, la ecuación de velocidad se ajusta a una cinética de pseudo-primer orden. Así pues, el tiempo de vida media del triclosán puede calcularse según la expresión:

$$t_{1/2} = \frac{\text{Ln}(0.5)}{-k}$$

Donde “k” es la pendiente de la recta obtenida cuando se representa el Ln [TCS] frente al tiempo.

Las ecuaciones de la recta obtenidas para esos tres pHs se muestran en la figura III.15, junto con los tiempos de vida media.

Figura III.15. Cinéticas de cloración y tiempos de vida media para el triclosán, obtenidos para 0.4 mg/L de cloro libre a pHs 6.3, 7.3 y 8.3. Concentración inicial de TCS 9 ng/mL.



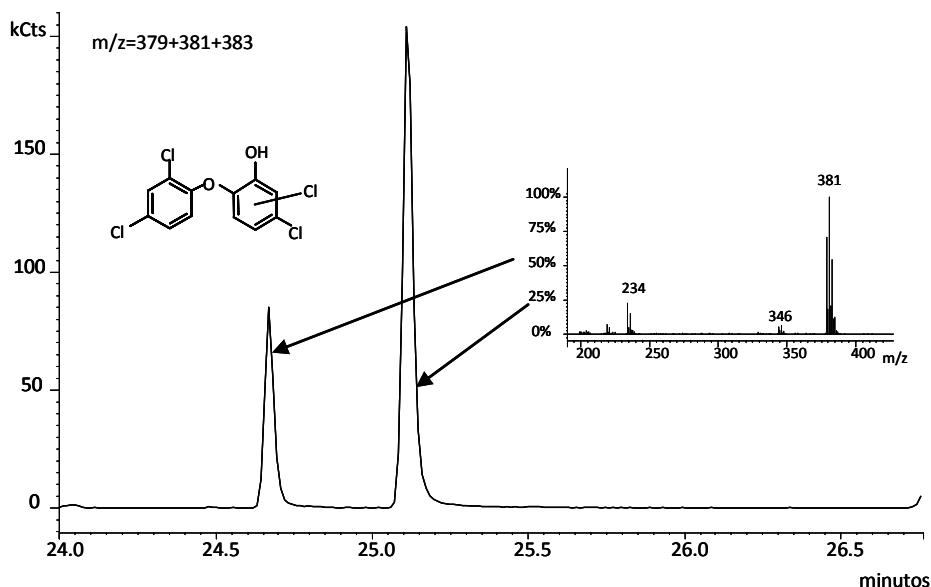
Los tiempos de vida media obtenidos confirman que la máxima reactividad del triclosán se observó a pH 7.3.

3.5.4. Identificación de los productos de transformación

Los experimentos realizados por Onodera y colaboradores en 1987 [Onodera S; 1987], pusieron de manifiesto la existencia de dos derivados tetraclorados del triclosán (Tetra I y II) y uno pentaclorado (Pentaclosano), así como la ruptura del enlace éter del fenoxifenol dando lugar al 2,4-diclorofenol y el 2,3,4-triclorofenol. En los estudios de cloración del triclosán se identificaron los siguientes compuestos:

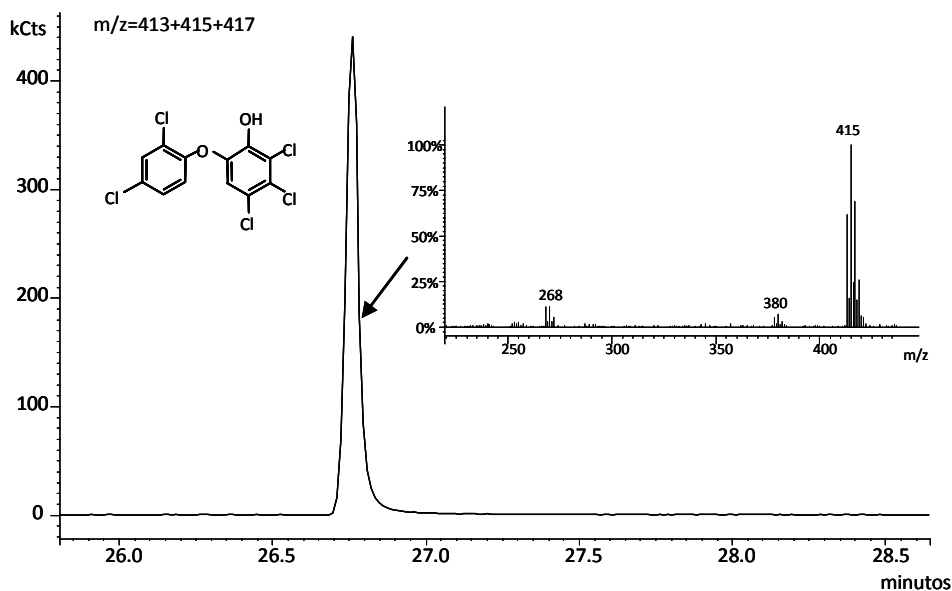
- A tiempos de retención superiores al triclosán, se encontraron tres picos cromatográficos. Los dos primeros presentaron el mismo espectro de masas, con una distribución isotópica correspondiente a un compuesto tetraclorado, cuyo pico base (m/z 379+381+383) aparece 34 unidades por encima del ión $[M-57]^+$ del triclosán (m/z 345+347). Estos dos picos se asignaron a los dos isómeros posicionales 4,5-dicloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol y 5,6-dicloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol, los cuales provienen de la sustitución electrófila aromática de un H, por un Cl, en las posiciones *orto* o *para* al grupo hidroxilo en la estructura del triclosán. En el espectro de masas de la figura III.16, se muestra el patrón de fragmentación para estos compuestos. Dado que no están disponibles comercialmente, no se ha podido confirmar su identidad con patrones, y por lo tanto establecer cual de los dos isómeros tetraclorados emerge antes de la columna cromatográfica. Por esta razón, los hemos denominado Tetra I y Tetra II, en base a sus tiempos de retención.

Figura III.16. Cromatograma y espectro de masas para los closanos Tetra I y Tetra II, como especies sililadas.



A tiempo de retención tres minutos y medio por encima del triclosán, se identificó otro pico cromatográfico cuyo espectro de masas corresponde a una especie pentaclorada de masa 68 unidades superior a la del triclosán, proveniente de la sustitución de dos hidrógenos por dos átomos de cloro. Tal como describió Onodera, corresponde al derivado pentaclorado del triclosán, el 4,5,6-tricloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol, figura III.17.

Figura III.17. Cromatograma y espectro de masas para el pentaclosano sililado.



- Junto con estos tres compuestos, aparecen también dos clorofenoles procedentes de la ruptura del enlace éter en la estructura del triclosán. El diclorofenol presenta el mismo tiempo de retención que el 2,4-diclorofenol, mientras que el triclorofenol obtenido no se corresponde con el descrito en la bibliografía. Para identificar el triclorofenol y confirmar que el diclorofenol corresponde al isómero sustituido en las posiciones 2,4-, se inyectaron patrones, en acetato de etilo, de los distintos isómeros de diclorofenoles y triclorofenoles, derivatizados con MTBSTFA y BSTFA, así como extractos de estas pruebas de cloración sililados con ambos derivatizantes. Los tiempos de retención obtenidos se muestran en la siguiente tabla (tabla III.13).

Tabla III.13. Tiempos de retención de los dicloro y triclorofenoles tert-butildimetilsililados y trimetilsililados.

Clorofenol	tr tert-butildimetilsililado (min)	tr trimetilsililado (min)
<i>3,5-diclorofenol</i>	15.38	12.45
<i>2,5-diclorofenol</i>	15.52	12.41
<i>3,4-diclorofenol</i>	16.08	13.42
<i>2,6-diclorofenol</i>	15.79	12.43
<i>2,4-diclorofenol</i>	15.83	12.63
<i>2,3-diclorofenol</i>	16.18	13.02
<i>2,3,4-triclorofenol</i>	18.22	15.28
<i>2,3,5-triclorofenol</i>	17.40	14.49
<i>2,3,6-triclorofenol</i>	17.80	14.67
<i>2,4,5-triclorofenol</i>	17.48	14.57
<i>2,4,6-triclorofenol</i>	17.41	14.22
<i>Diclorofenol detectado</i>	15.83	12.63
<i>Triclorofenol detectado</i>	17.41	14.22

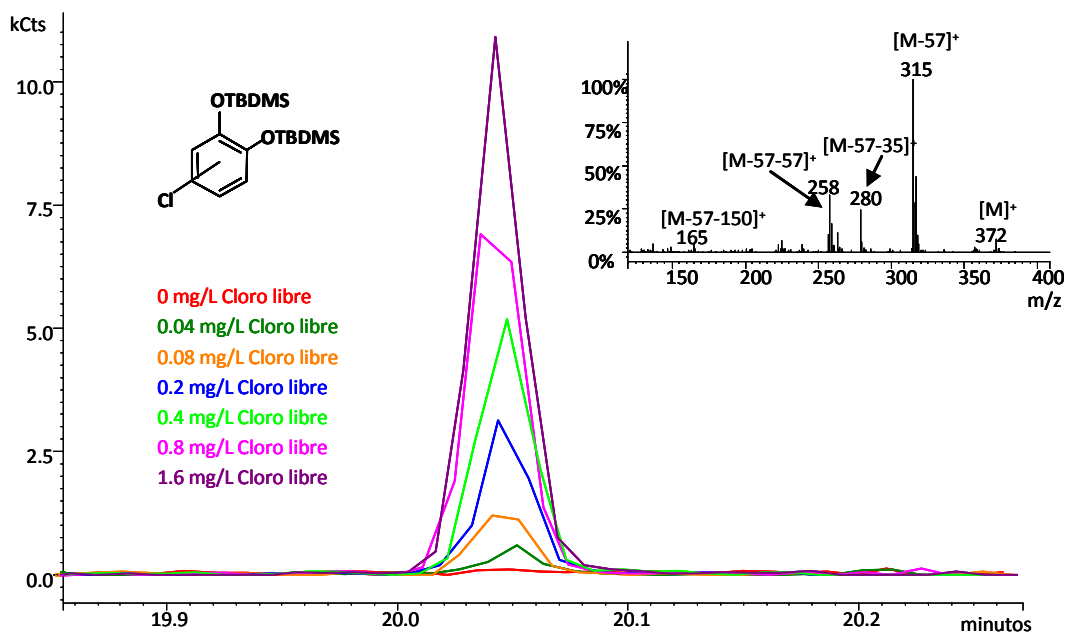
Como se puede observar en la tabla III.13, la utilización de MTBSTFA como derivatizante no permitió resolver varios isómeros a línea base. Experimentos adicionales, usando BSTFA, posibilitaron la identificación del dicloro y triclorofenol procedentes de la degradación del triclosán. Para el caso de triclorofenol, el uso de MTBSTFA indica 3 posibles candidatos: el 2,3,5-; 2,4,5- y 2,4,6-TCF. La utilización del BSTFA permitió resolver mejor estos compuestos, y confirmar que la señal para el compuesto trimetilsililado a 14.2 minutos presente en el extracto de los experimentos de halogenación, corresponde con el 2,4,6-triclorofenol. Los derivados tert-butildimetilsililados del 2,4-DCF y 2,6-DCF presentaron el mismo tiempo de retención. La derivatización del extracto y de los patrones con BSTFA confirmó que el pico que emerge a 12.6 minutos corresponde con el 2,4-DCF.

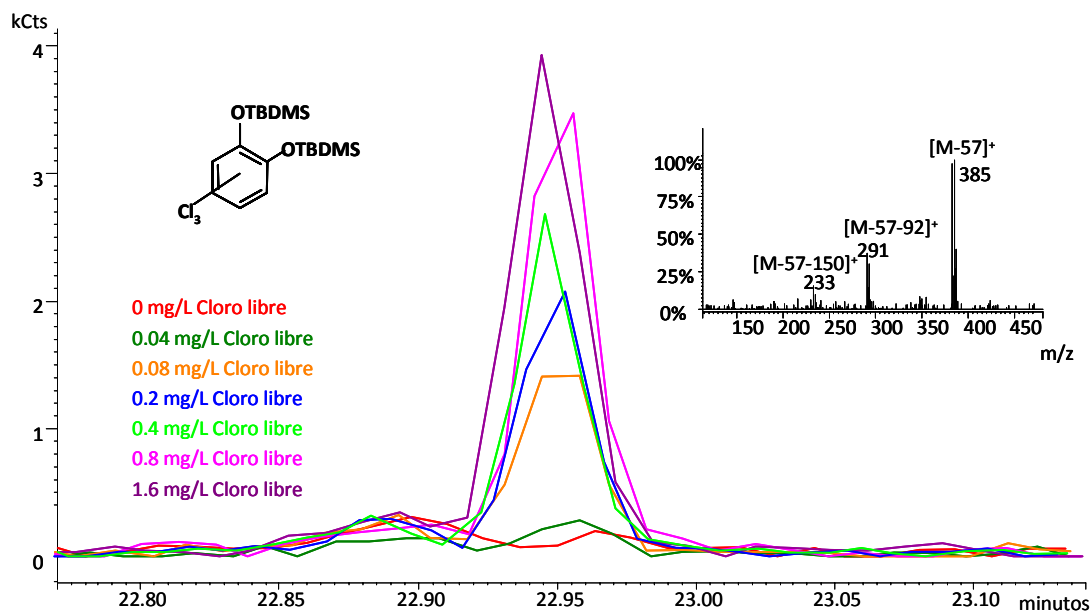
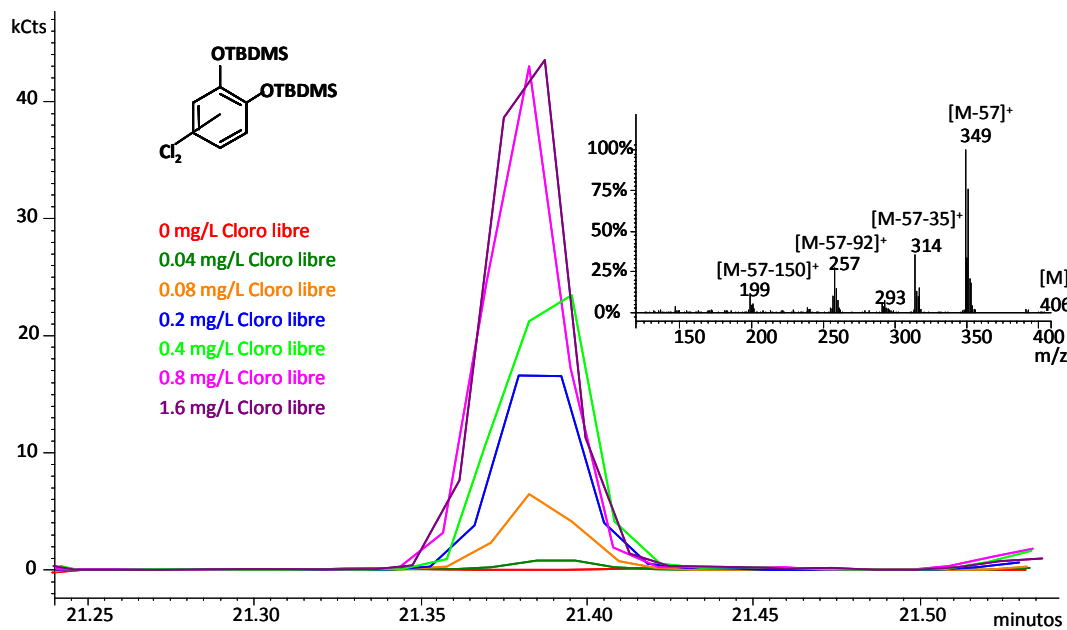
La presencia del 2,4,6-triclorofenol en el medio de reacción, en vez del 2,3,4-triclorofenol, indica que este compuesto proviene de la cloración del 2,4-diclorofenol, proceso cinéticamente muy favorable. El 2,4-diclorofenol se forma por la ruptura del enlace éter en la estructura del triclosán.

- Además de estos cinco productos, se detectó también la presencia de otras especies halogenadas entre los tiempos de retención del 2,4,6-triclorofenol y el triclosán. Estas especies son minoritarias, y aparecen a concentraciones de cloro elevadas, cuando no se añade el agente reductor (tiosulfato sódico) para eliminar el exceso de oxidante. Experimentos adicionales utilizando el ácido ascórbico (vitamina C) como agente reductor, tampoco mostraron la presencia de estos subproductos. En la siguiente figura (fig. III.18) se muestran los cromatogramas de esas especies,

obtenidos para un tiempo de reacción de 1 hora y distintas concentraciones de cloro (entre 0 y 1.6 mg/L), así como los espectros de masas correspondientes. Para estas pruebas no se detuvo la reacción con un reductor, sino que una vez transcurrido el tiempo establecido, se ajustó el pH a 2.5 e inmediatamente, las muestras se concentraron mediante SPE. De acuerdo con los espectros de masas obtenidos se identificaron como derivados tert-butildimetilsililados de dihidroxifenoles (resorcinoles) sustituidos con uno, dos o tres átomos de cloro. Estos se forman por la ruptura del enlace éter del TCS o los closanos tetra y pentaclorados, permaneciendo los dos grupos hidroxilo en el mismo anillo aromático. El pico base en los espectros corresponde a la pérdida del grupo tert-butilo de uno de los dos hidroxilos sililados. El resto de fragmentaciones proceden de la pérdida de cloro (35 unidades), tert-butilo (57 unidades), cloro y tert-butilo (92 unidades) ó cloro y tert-butildimetilsilil (150 unidades).

Figura III.18. Cromatogramas, espectros de masas y estructuras propuestas para los productos minoritarios de cloración del triclosán, a distintas concentraciones de cloro libre.

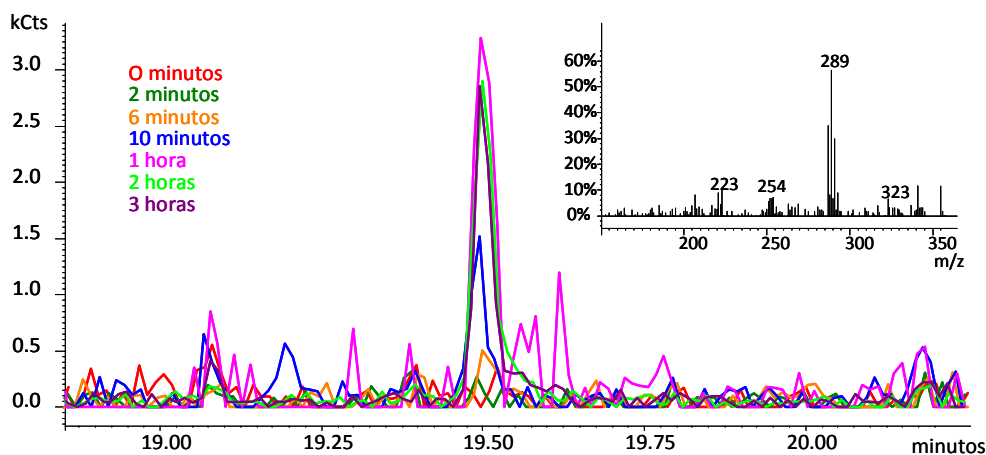




En la bibliografía no existen referencias describiendo la formación de estos resorcinoles en presencia de cloro libre, si bien es cierto que Ferrer y colaboradores [Ferrer I; 2004] detectaron el clorofenol dihidroxilado como un intermedio inestable en la fotodegradación del triclosán.

Además de los compuestos señalados, en algunas pruebas realizadas con elevadas concentraciones de cloro y tiempos de reacción largos, se encontró a 19.5 minutos un compuesto cuyo espectro corresponde con un tetraclorofenol. Debido a que la señal resultó ser poco intensa y puesto que sólo apareció tras un tiempo de reacción elevado, no se consideró en el estudio de evolución de los subproductos de cloración del TCS, al igual que los resorcinoles. En la siguiente figura (figura III.19), se muestra el pico correspondiente al tetraclorofenol así como su espectro de masas.

Figura III.19. Cromatogramas para el tetraclorofenol (producto minoritario) a distintos tiempos de reacción, en agua a pH 7.3 con 0.4 mg/L de cloro libre y 10 ng/mL de triclosán.



3.5.5. Evolución temporal de los productos mayoritarios

Una vez identificados los compuestos de halogenación del triclosán, formados en presencia de cloro libre, se investigó su evolución temporal para poner de manifiesto la estabilidad de los mismos. Para llevar a cabo este estudio, se prepararon una serie de muestras de agua ultrapura con distintas concentraciones de cloro libre (0.4 y 1.4 mg/L), a pH 7.3, y con una cantidad inicial de triclosán de 50 ng/mL. Los resultados obtenidos para distintos tiempos de reacción se observan en las figuras III.20.A y III.20.B, en donde se representa la señal relativa al área de pico del triclosán para tiempo 0 minutos.

Figura III.20.A. Evolución temporal de los cloro-derivados del TCS con 0.4 mg/L de cloro libre. Concentración inicial de TCS 50 ng/mL.

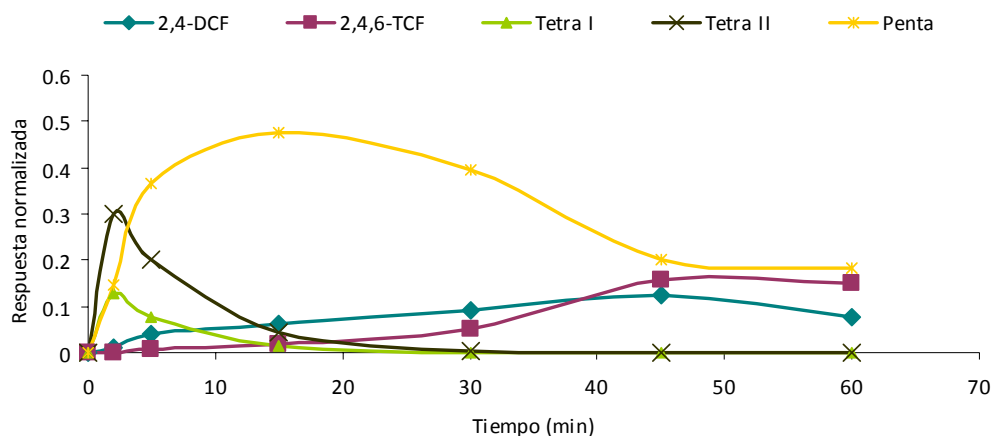
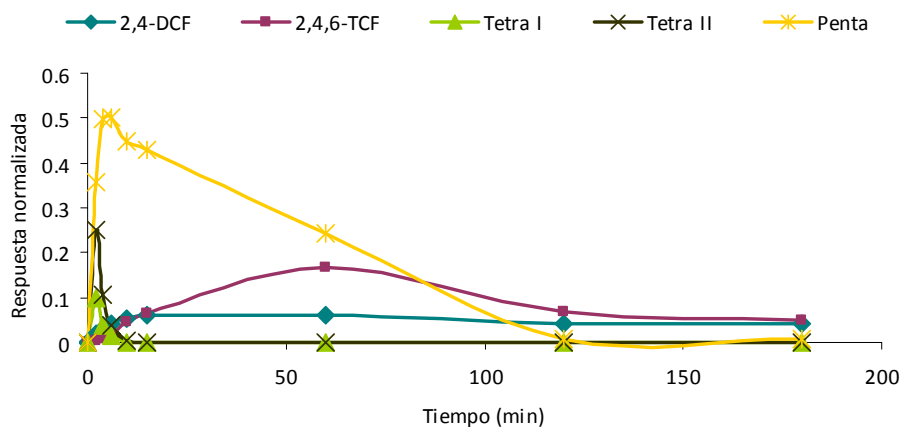


Figura III.20.B. Evolución temporal de los cloro-derivados del TCS con 1.4 mg/L de cloro libre. Concentración inicial de TCS 50 ng/mL.

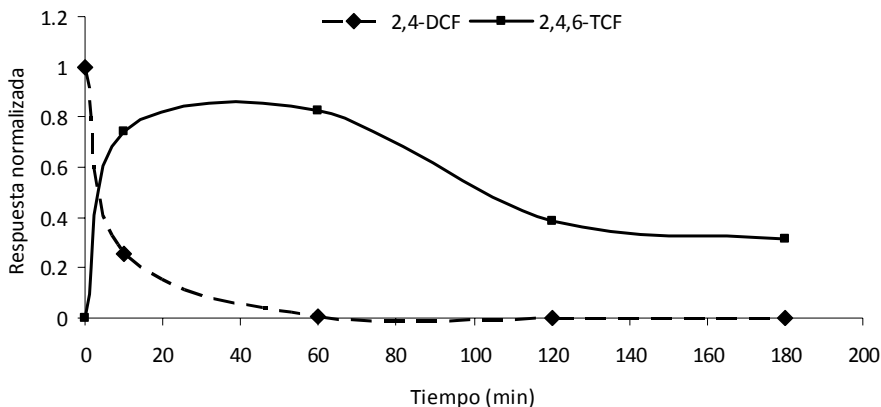


Como se puede comprobar en las figuras anteriores, a tiempos relativamente cortos los fenoxifenoles tetraclorados fueron los subproductos predominantes. La respuesta del Tetra II fue mayor frente al Tetra I, de modo que se presume que el Tetra II corresponde con el derivado 4,5-dicloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol, puesto que la posición *para* al hidroxilo presenta menor impedimento estérico frente a la posición *orto*. En un momento dado, la señal del Pentaclosano aumenta exponencialmente en detrimento de la señal de los Tetraclosanos hasta que desciende a

favor de los clorofenoles. Como productos finales, el 2,4-diclorofenol y el 2,4,6-triclorofenol, se mantuvieron a niveles prácticamente constantes dentro del intervalo de tiempo considerado.

Experimentos adicionales, realizados con el 2,4-DCF para observar su comportamiento en presencia de cloro, así como estimar su tiempo de vida media con 1.44 mg/L de cloro libre y 50 ng/mL de 2,4-DCF ($t_{1/2}$ 7.8 minutos) mostraron la conversión íntegra del 2,4-DCF en 2,4,6-TCF en 1 hora. A partir de ese momento la concentración de 2,4,6-TCF comenzó a decaer hasta la mitad, manteniéndose prácticamente constante a partir de las 2 horas, figura III.21.

Figura III.21. Evolución temporal del 2,4-DCF a 2,4,6-TCF con 1.44 mg/L de cloro libre. Concentración inicial de 2,4-DCF 50 ng/mL.



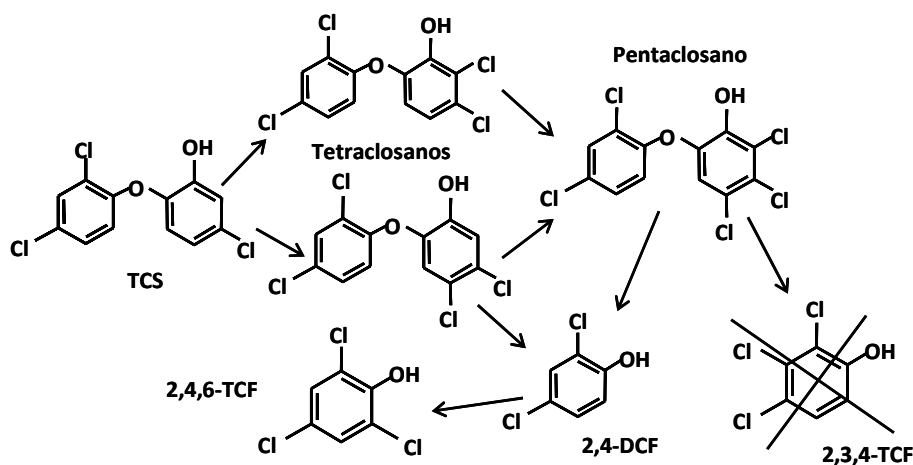
El rendimiento molar de la conversión del TCS en 2,4-DCF y 2,4,6-TCF se estudió a tres pHs diferentes usando 0.4 mg/L de cloro libre, y una concentración inicial de triclosán de 50 ng/mL, para tiempos de reacción de 5 y 15 minutos. Los porcentajes de conversión se muestran en la tabla III.14.

Tabla III.14. Rendimientos molares (%) de conversión del triclosán en los clorofenoles relacionados para 0.4 mg/L de cloro libre (N=3). Concentración inicial de TCS 50 ng/mL.

Compuesto	pH 6.3		pH 7.3		pH 8.3	
	5 min	15 min	5 min	15 min	5 min	15 min
2,4-DCF	2.8±0.2	7.1±0.6	4.4±0.5	8.8±0.8	1.0±0.2	5.0±0.7
2,4,6-TCF	0.30±0.05	0.59±0.05	0.9±0.1	2.5±0.4	0.22±0.04	1.8±0.3

El mecanismo de degradación de triclosán y su conversión final en 2,4-DCF y 2,4,6-TCF se muestra en la siguiente figura, figura III.22. Cabe destacar que tanto el 2,4-DCF como el 2,4,6-TCF son considerados por la EPA como candidatos a la lista de disruptores endocrinos y posibles carcinógenos [<http://www.epa.gov>].

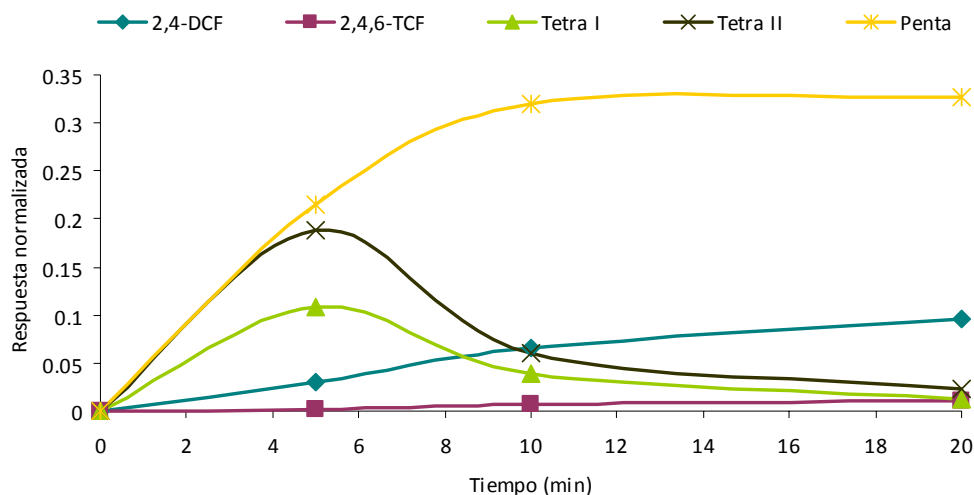
Figura III.22. Mecanismo de degradación del triclosán en aguas cloradas.



3.5.6. Estudios de cloración en agua de grifo

La reactividad del triclosán en agua ultrapura, con un contenido conocido de cloro libre, fue confirmada realizando experimentos similares en agua de grifo. La muestra se recogió en una botella ámbar y, previamente a la realización de los experimentos, se determinó la concentración de cloro libre con un fotómetro tal como se ha indicado en la sección 3.1.4. La concentración obtenida de cloro libre en la muestra fue de 0.43 ± 0.3 mg/L. Se tomaron varias alícuotas de 250 mL, las cuales fueron distribuidas en botellas ámbar de 300 mL. Se tamponaron a pH 7.3 y se adicionó un patrón de triclosán en metanol para tener una concentración en agua de 50 ng/mL. Tras un tiempo de reacción debidamente controlado, se añadió el agente reductor eliminando así el exceso de cloro en el medio, y se concentró la muestra mediante la metodología de SPE desarrollada. En estas condiciones, el tiempo de vida media del triclosán fue de 1.9 minutos, dato análogo al obtenido para agua ultrapura con concentración de cloro similar ($t_{1/2}$ 2.2 min para 0.4 mg/L de cloro libre). En la figura III.23, se muestra el perfil de formación de los compuestos derivados del triclosán en agua de grifo.

Figura III.23. Perfil de formación de los compuestos clorados en agua de grifo conteniendo 0.43 mg/L de cloro libre. Concentración inicial de TCS 50 ng/mL.

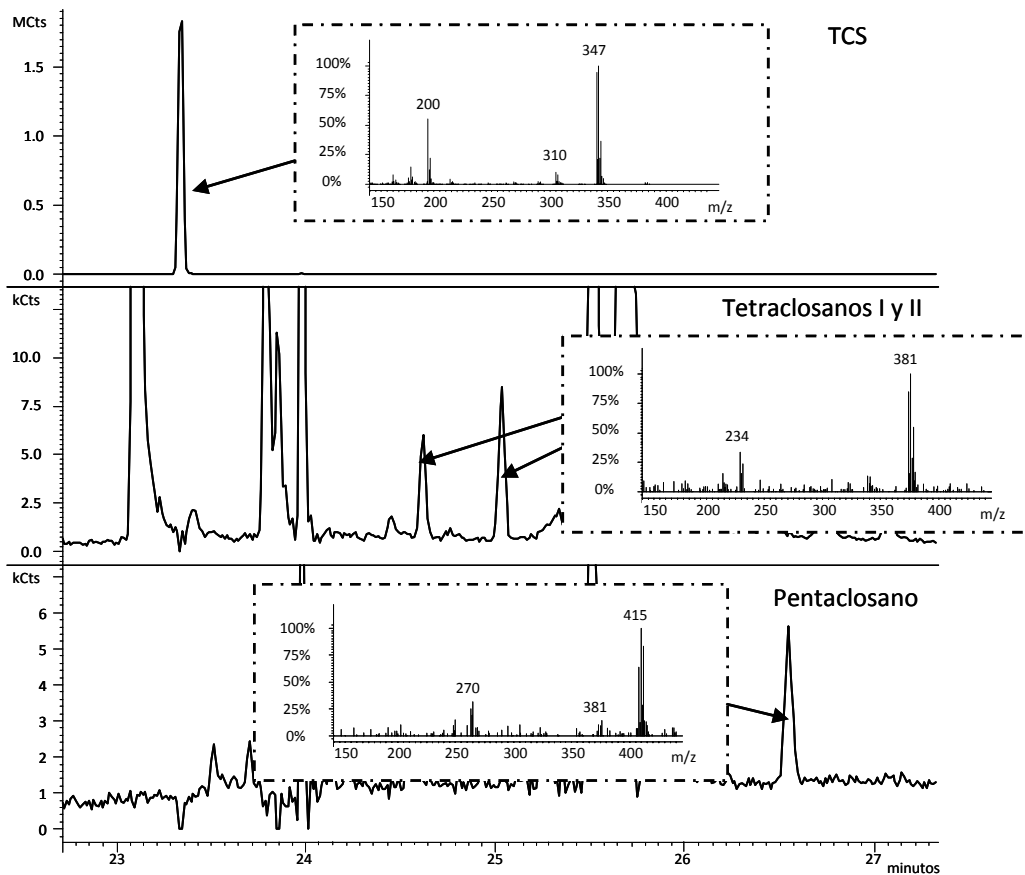


La evolución temporal de los compuestos siguió un perfil análogo al mostrado en la figura III.20.A, pudiendo extrapolar los resultados obtenidos con agua ultrapura a agua de grifo. De este modo, se pone de manifiesto que el triclosán puede sufrir procesos de cloración en agua de grifo, lo que se traduce en la potencial exposición por vía dérmica a sus productos de reacción y, por supuesto, en la descarga de éstos al medio acuático a través de las aguas residuales.

3.5.7. Presencia de compuestos halogenados en muestras reales

Dado que el triclosán reacciona rápidamente en aguas cloradas, se evaluó la presencia de los productos de cloración en muestras de agua residual debido al uso de PPCPs, conteniendo triclosán en su formulación, y su contacto directo con agua de grifo clorada. En las muestras de agua residual, se detectaron 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol. Con respecto a la presencia de los closanos policlorados, sus niveles son muy bajos aunque en algunas muestras, con un alto contenido de triclosán, se encontraron trazas de los mismos. En la figura III.24, se puede observar la señal cromatográfica de estos derivados halogenados del triclosán en una muestra de agua residual sin tratar, con una concentración medida de triclosán de 14 ng/mL.

Figura III.24. Cromatogramas de GC-MS mostrando la presencia de triclosán, tetra I, tetra II y pentaclosano en una muestra de agua residual sin tratar con alto contenido en triclosán.



3.6. Halogenación de parabenos

3.6.1. Pruebas preliminares

Al igual que el triclosán, los parabenos son compuestos fenólicos susceptibles de sufrir sustituciones electrófilas aromáticas en la posición *orto* al grupo hidroxilo. Para verificar este comportamiento, se realizaron una serie de pruebas en agua ultrapura, tamponada a pH 7.3, con adición de cloro libre a nivel de 0.4 mg/L. Tras la adición de los patrones en metanol de metilparaben y propilparaben, las muestras se dejaron reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos, tras los cuales el exceso de cloro libre fue eliminado con tiosulfato sódico. Las muestras fueron concentradas, mediante la metodología de SPE desarrollada para el análisis de parabenos en muestras acuosas y, tras la derivatización de los extractos, se inyectó 1 μ L en el sistema GC-MS en *full scan*. En los cromatogramas obtenidos se observó una clara disminución en la señal de ambos parabenos (tabla III.15), lo que indicó que estos también reaccionan en medios clorados. En base a estos primeros resultados, se llevó a cabo el estudio sistemático de los parámetros que afectan a la halogenación los parabenos más comunes en PPCPs (MeP, EtP, PrP y BuP) cuando entran en contacto con agua conteniendo cloro libre.

Tabla III.15. Señal de MeP y PrP tras 30 minutos de reacción. Concentración de cloro libre 0.4 mg/L y 40 ng/mL para cada analito, al inicio de la reacción.

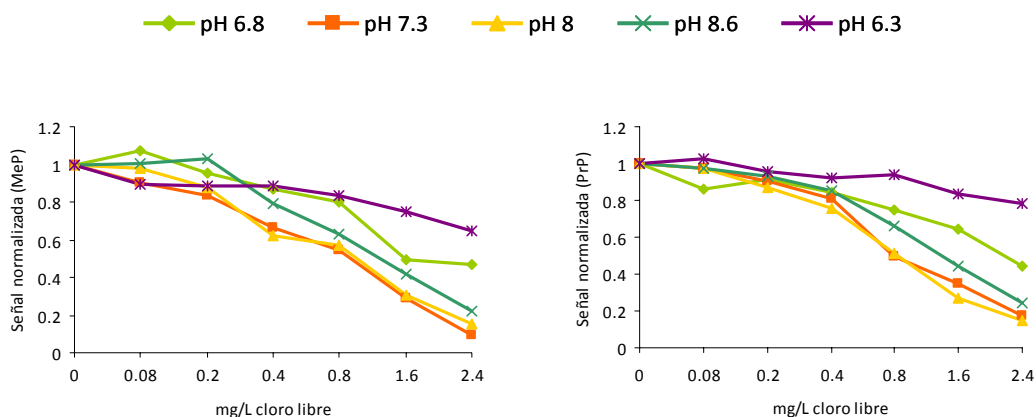
Señal relativa a tiempo 0 minutos	
MeP	11 %
PrP	13 %

3.6.2. Degradación a distintos pHs y concentraciones de cloro libre en agua ultrapura

El pH del medio y la concentración de cloro fueron dos de los factores estudiados previamente a la evaluación de la cinética de reacción. Del mismo modo que para el triclosán, se consideraron pHs comprendidos entre 6 y 9 unidades, así como concentraciones de cloro libre entre 0 y 2.4 mg/L. Se realizaron una serie de experimentos usando muestras de 100 mL de agua, tamponadas a los pHs anteriores, con una concentración inicial de 40 ng/mL para uno sólo de los analitos considerados (MeP, EtP, PrP y BuP). Tras un tiempo de reacción de 10 minutos, se añadieron 10 mg de tiosulfato sódico para eliminar el exceso de cloro libre presente en el medio. Las muestras

se ajustaron a pH ácido y se concentraron con la metodología desarrollada para la extracción de estos compuestos en muestras acuosas mediante SPE, descrita en este capítulo. Los resultados obtenidos para los cuatro compuestos fueron idénticos. En la figura III.25, se muestra el comportamiento para el MeP y el PrP.

Figura III.25. Perfil de degradación de MeP y PrP para concentraciones de cloro y pHs variables. Tiempo de reacción 10 minutos, concentración inicial de analito 40 ng/mL.



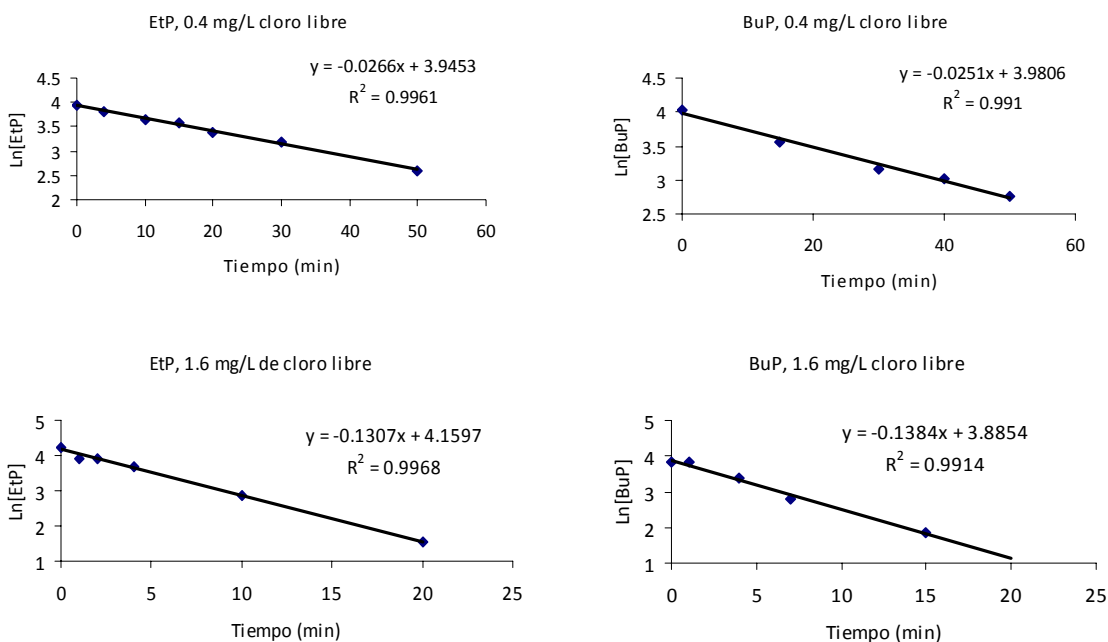
En ambas figuras, se observa una clara disminución de la señal de los compuestos cuando la concentración de cloro libre sobrepasa 0.4 mg/L. Este comportamiento fue más acusado a pHs comprendidos entre 7.3 y 8.0, puesto que el ácido hipocloroso todavía está presente en el medio, mientras que el equilibrio fenol-fenolato de los parabenos (pK_a 8.2-8.3) comienza a desplazarse hacia la forma básica.

3.6.3. Cinéticas de halogenación en agua ultrapura y agua de grifo

La cinética de degradación de los parabenes en agua ultrapura fue estudiada considerando dos concentraciones de cloro libre diferentes: 0.4 y 1.6 mg/L (5.63 y 22.53 μ M como hipoclorito, respectivamente). Para la realización de estos experimentos, alícuotas de 250 mL de agua tamponada a pH 7.3 fueron fortificadas individualmente con cada compuesto a una concentración de 9-10 ng/mL (45-70 nM). Tras un tiempo dado, se detuvo la reacción y se concentraron las

muestras. Los extractos obtenidos, una vez derivatizados, fueron inyectados en el sistema GC-MS. Dado que la concentración de cloro presente en el medio se mantuvo en exceso, la velocidad de reacción fue función únicamente de la concentración de cada paraben. La representación del logaritmo neperiano de la concentración de analito frente al tiempo de reacción transcurrido, proporcionó las siguientes representaciones, figura III.26. De nuevo la desaparición de los analitos obedece a una cinética de orden 1.

Figura III.26. Cinéticas de degradación para EtP y BuP con 0.4 y 1.6 mg/L de cloro libre. Concentración inicial de analito 10 ng/mL.



Los estudios de velocidad de reacción también se realizaron utilizando agua de grifo con dos concentraciones de cloro libre diferentes. Las muestras empleadas en estos estudios contenían originalmente 0.46 y 0.2 mg/L de cloro libre. La primera se utilizó tal como se obtuvo, para comparar con los tiempos de vida media para agua ultrapura con 0.4 mg/L de cloro, mientras que la segunda fue fortificada con la disolución de hipoclorito sódico para obtener una concentración final de cloro libre de 1.6 mg/L. Tras el ajuste del pH del medio a 7.3 y la adición del correspondiente compuesto

(9-10 ng/mL en agua) se dejaron reaccionar los mismos tiempos seleccionados para los experimentos con agua ultrapura. Los resultados obtenidos mostraron que para el agua de grifo, la cinética de reacción sigue el mismo comportamiento que para agua ultrapura, obteniendo los tiempos de vida media que se recogen en la tabla III.16.

Tabla III.16. Tiempos de vida media (minutos) de los parabenos para 0.4 y 1.6 mg/L de cloro libre. Concentración inicial de analito 10 ng/L.

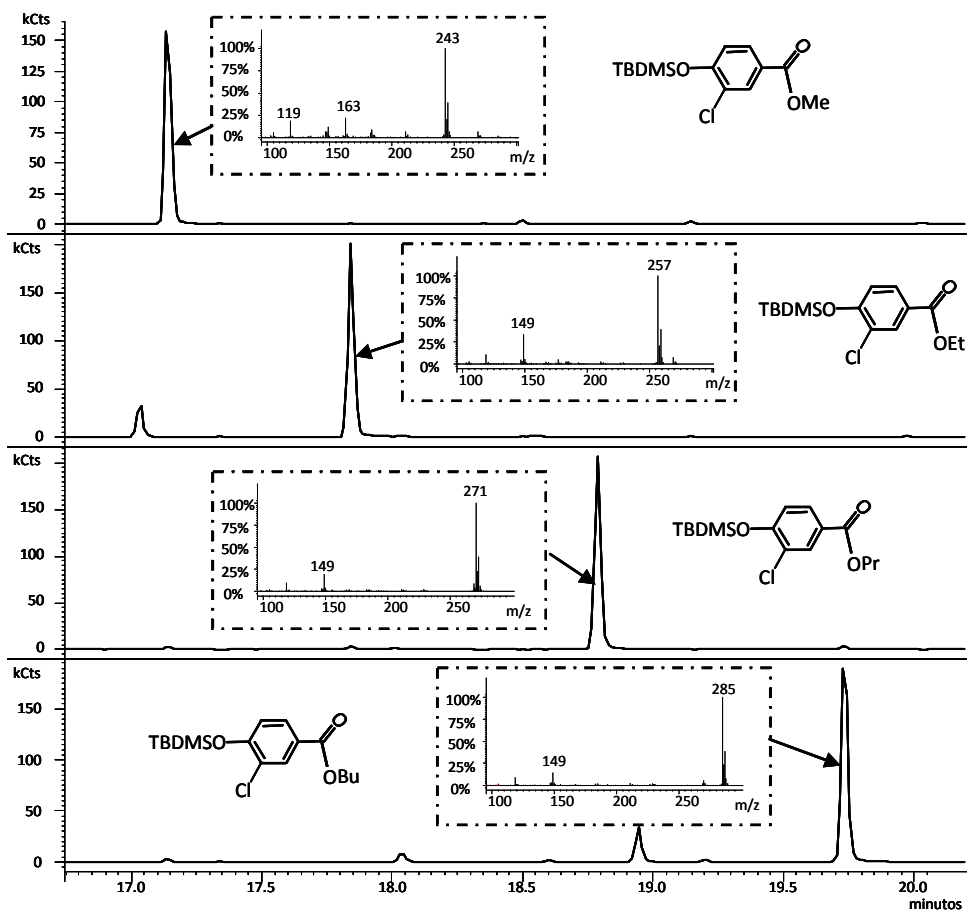
	t _{1/2} (min)			
	Agua Ultrapura		Agua de grifo	
Cloro libre (mg/L)	0.4	1.6	0.46	1.6
<i>MeP</i>	33.8	4.6	31.5	4.7
<i>EtP</i>	26.1	5.3	31.5	4.7
<i>PrP</i>	30.9	4.2	30.3	4.6
<i>BuP</i>	27.6	5.0	29.9	4.4

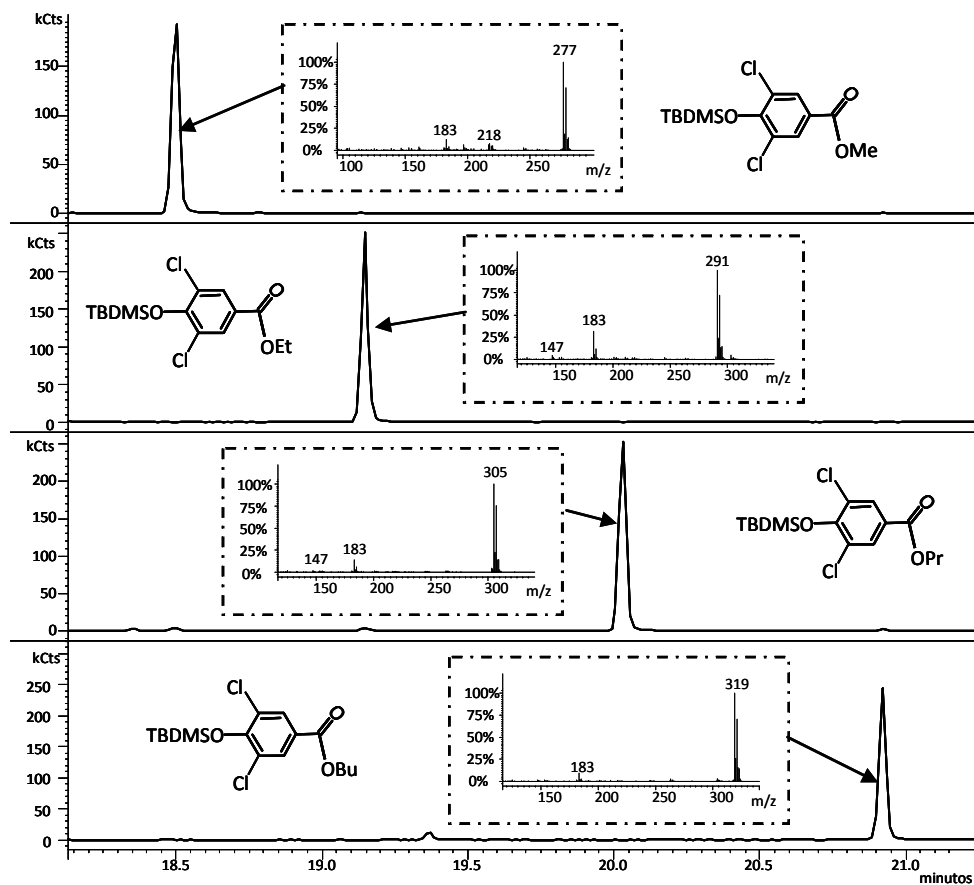
Tal como se puede comprobar, los tiempos de vida media para agua ultrapura con adición de hipoclorito y agua de grifo clorada fueron muy similares. Teniendo en cuenta que los experimentos se llevaron a cabo en distintos días, y sin control exacto de la temperatura del agua (15 ± 2°C), las diferencias entre los valores encontrados para ambas muestras son mínimas.

3.6.4. Identificación de los productos de transformación: Parabenos clorados y bromados.

La halogenación de los parabenos en agua de grifo dió lugar a la formación de cinco tipos de derivados halogenados. Los espectros de masas para los dos productos mayoritarios, presentes en el medio, tienen un perfil isotópico típico de compuestos monoclorados y diclorados. Los picos base en sus espectros aparecen a 34 y 68 unidades de m/z por encima de los correspondientes al paraben de partida, por lo que se deduce que proceden de la sustitución electrófila aromática de un átomo de hidrógeno por un átomo de cloro en la posiciones *orto* al hidroxilo, puesto que la posición *para* está bloqueada con el grupo éster, figura III.27.

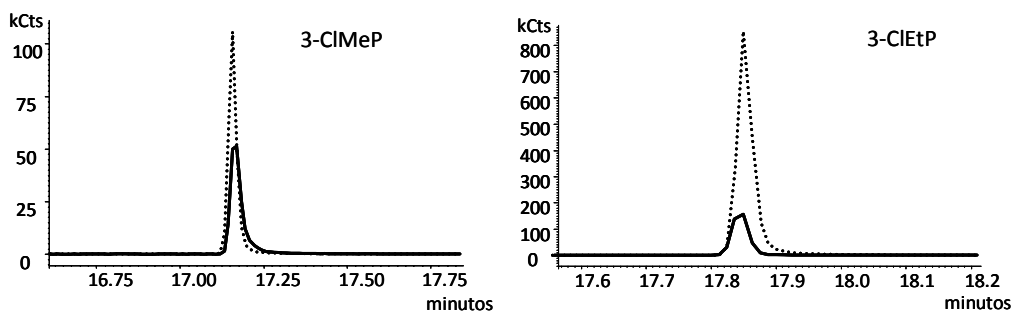
Figura III.27. Cromatogramas y espectros de masas para los compuestos monoclorados y diclorados procedentes de los parabenos estudiados.





La existencia de patrones comerciales de 3-clorometilparaben (3-ClMeP) y 3-cloroetilparaben (3-ClEtP) permitió confirmar la identidad de estos dos subproductos en los experimentos de cloración realizados. Para ello, se prepararon disoluciones individuales en metanol de estos dos compuestos de 2000 mg/L y, por dilución con acetato de etilo, dos patrones de concentraciones 0.7 y 2 mg/L. Alícuotas (500 μ L) estos patrones más diluidos fueron derivatizados en las condiciones utilizadas para los parabenes e inyectados en el sistema GC-MS. El cromatograma obtenido para cada uno de los patrones, muestra un pico cuyo tiempo de retención y espectro de masas coinciden con los correspondientes subproductos de cloración identificados para el MeP y el EtP, figura III.28.

Figura III.28. Patrones (línea discontinua) de 3-ClMeP (0.7 mg/L) y 3-ClEtP (2 mg/L) solapados con los subproductos monoclorados del MeP y EtP, detectados en las pruebas de halogenación (línea continua).



Los tiempos de vida media para estos compuestos fueron estudiados en las mismas condiciones de pH y concentraciones de cloro libre utilizadas para los parabenos. De nuevo, la desaparición de ambos compuestos obedeció a una cinética de pseudo-primer orden. Los tiempos de vida media evaluados en agua ultrapura se muestran en la tabla III.17.

Tabla III.17. Cinéticas de cloración para 3-ClMeP y 3-ClEtP junto con sus tiempos de vida media en agua ultrapura. Concentración inicial de analito 10 ng/mL.

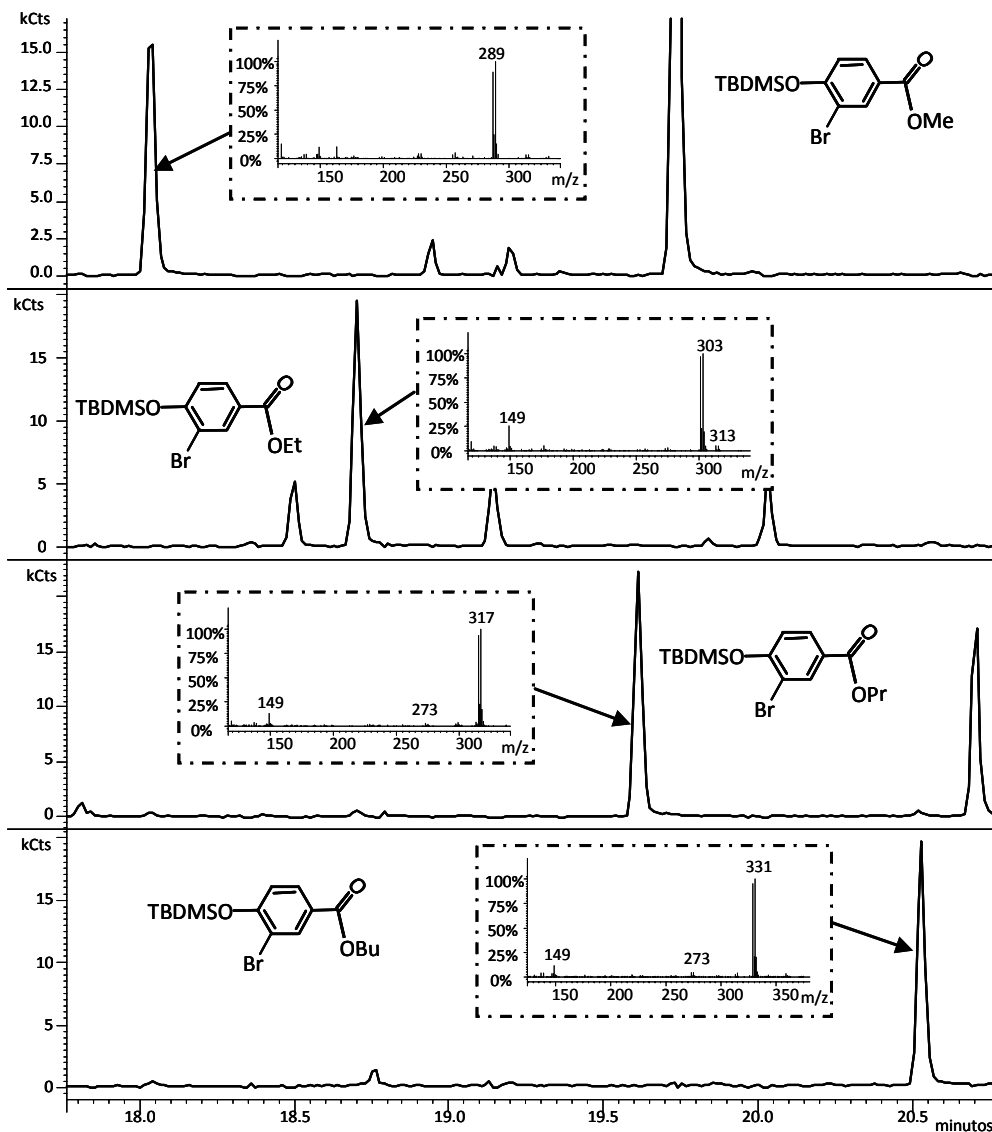
	Cloro libre	R ²	t _{1/2} (min)
3-ClMeP	0.4 mg/L	0.9927	31.2
	1.6 mg/L	0.9984	6.6
3-ClEtP	0.4 mg/L	0.9907	31.9
	1.6 mg/L	0.9935	8.1

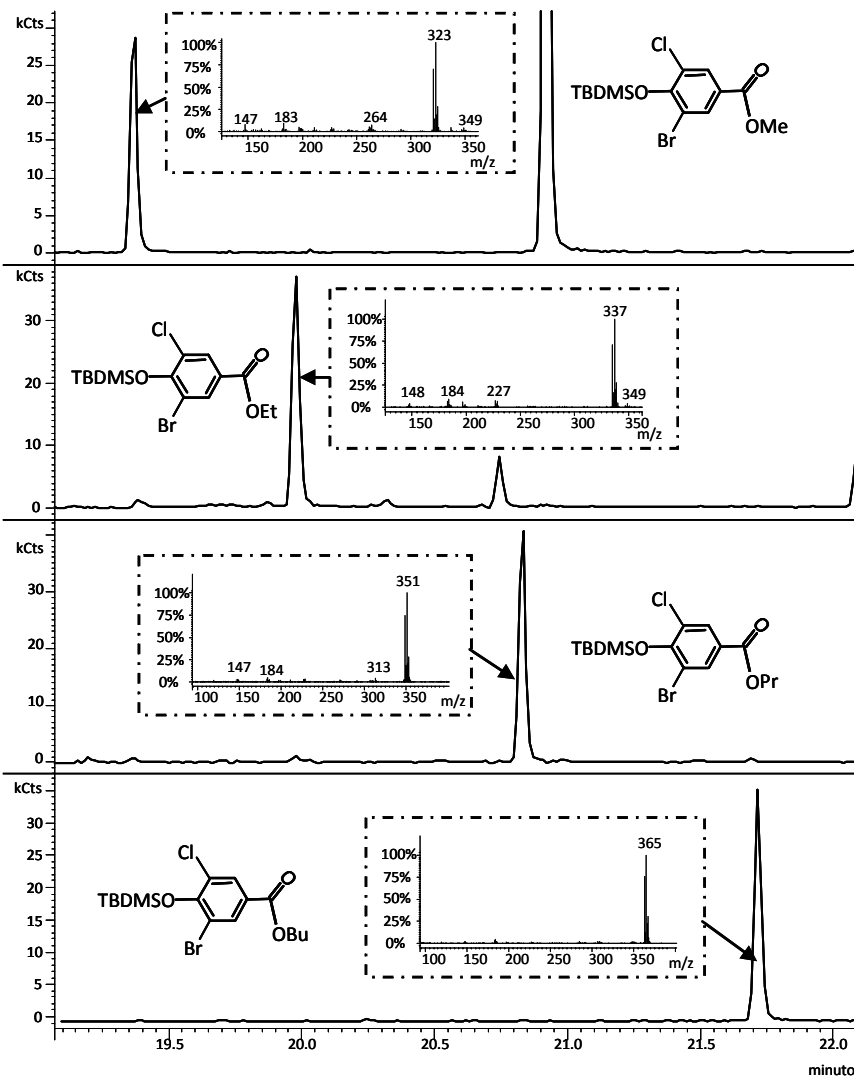
Como se puede comprobar los tiempos de vida media fueron similares a los de los compuestos de partida (tabla III.16) para las dos concentraciones de cloro libre ensayadas. Además, se confirmó la formación de los derivados diclorados a partir del 3-ClMeP y 3-ClEtP.

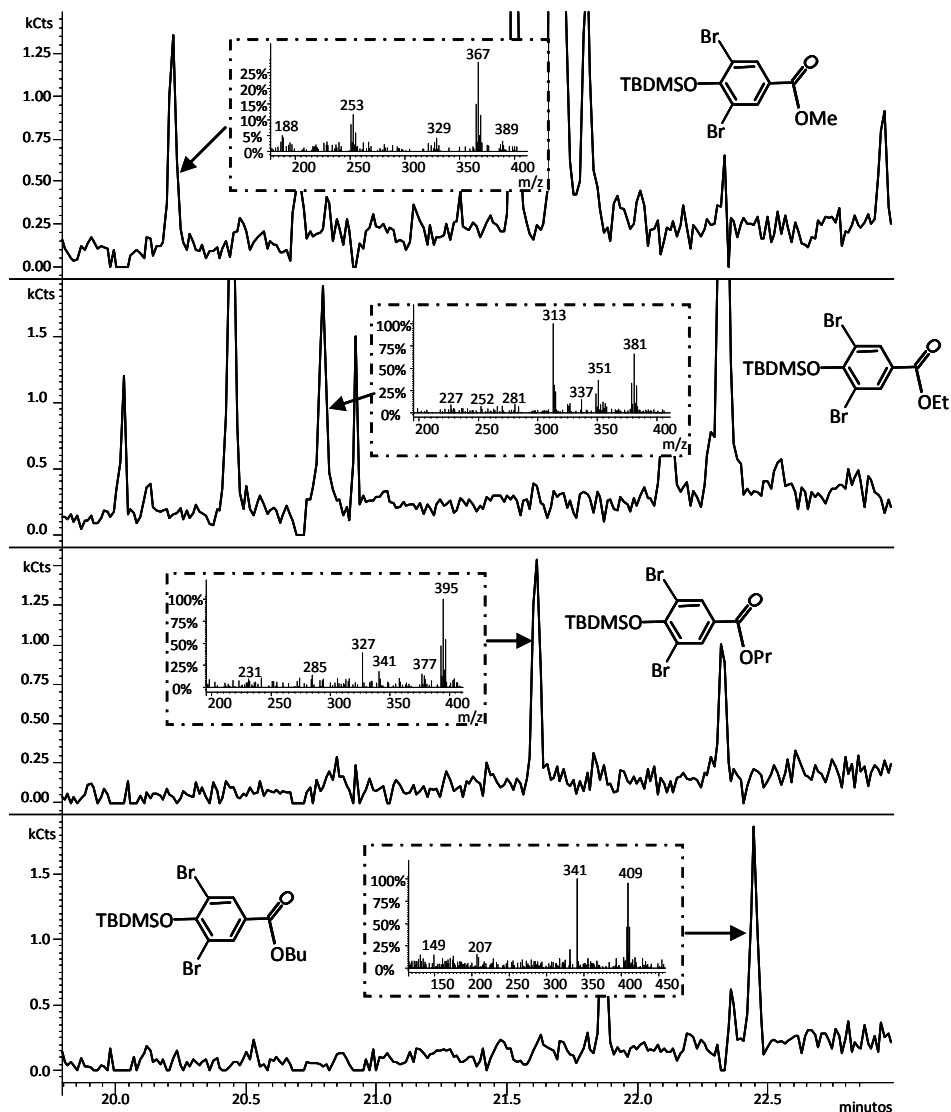
Los experimentos realizados con agua de grifo y parabenos revelaron la formación de los derivados clorados descritos anteriormente, así como tres productos adicionales para cada analito de partida. En base a sus espectros de masas se identificaron como compuestos bromados. La formación de estos nuevos productos podría deberse a la existencia de trazas de bromuro en el agua de grifo, el cual es oxidado a bromo en presencia de hipoclorito, reaccionando finalmente con el anillo aromático de los compuestos fenólicos mediante una sustitución electrófila aromática [Inaba

K; 2006]. En la figura III.29 se puede observar los cromatogramas, con los respectivos espectros de masas, para los compuestos bromados así como sus estructuras.

Figura III.29. Cromatogramas de los derivados bromados de los parabenes encontrados en experimentos realizados con agua de grifo, con sus respectivos espectros de masas y estructuras propuestas.



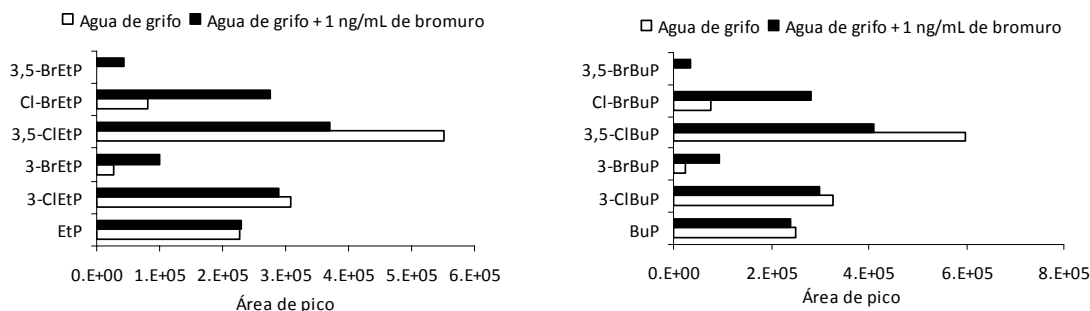




Para verificar esta hipótesis, se llevaron a cabo una serie de experimentos con agua de grifo con un contenido de cloro libre de 0.53 mg/L. Una vez tamponada a pH 7.3, la muestra fue dividida en dos alícuotas de 250 mL, adicionando a una de ellas 1 ng/mL de bromuro, como bromuro potásico. A ambas alícuotas se les añadió un patrón conteniendo los cuatro parabenes, de modo que la concentración de estos en agua fuese de 10 ng/mL, y se dejó reaccionar durante 20 minutos. Los

resultados obtenidos mostraron una disminución significativa de la señal de los compuestos clorados a favor de los bromados en la muestra fortificada con bromuro potásico, lo que sugirió una competencia entre ambos dentro de la reacción de sustitución electrófila aromática. En la figura III.30, se observa la influencia de la adición de 1 ng/mL de bromuro en la formación de los derivados halogenados para el EtP y el BuP.

Figura III.30. Influencia de la adición de 1 ng/mL de bromuro en la formación de los derivados halogenados del EtP y del BuP. Agua de grifo (0.53 mg/L cloro libre) a pH 7.3, tiempo de reacción de 20 minutos.



Para confirmar la mayor tendencia del bromo que el cloro para dar lugar a reacciones de sustitución con los parabenos, se realizaron estudios con agua ultrapura con una concentración fija de cloro libre (0.4 mg/L) y niveles crecientes de bromuro (1, 10 y 65 ng/mL) como sal potásica. El tiempo de reacción y la concentración inicial de cada paraben se mantuvieron en 20 minutos y 10 ng/mL, respectivamente. Los resultados, tabla III.18, pusieron de manifiesto que la adición de bromo al anillo fenólico es mucho más favorable frente a la de cloro, lo que concuerda con las predicciones de Richardson [Richardson SD; 2003]. Así, cuando la concentración inicial de bromuro es 40 veces inferior a la de cloro libre (10 ng/mL frente a 400 ng/mL, respectivamente) predominan los productos de transformación bromados frente a los clorados.

Como consecuencia de este comportamiento, las especies bromadas se esperan como sub-productos mayoritarios de reacción entre los parabenos y agua de grifo clorada en aquellas regiones donde las captaciones presentan niveles de bromuro elevados, como son zonas costeras o áreas con depósitos salinos, los cuales pueden contener hasta 1 mg/L de bromuro [von Gunten U; 2003][Inaba K; 2006]. Cabe indicar que, de forma genérica, los compuestos bromados presentan mayor toxicidad frente a los clorados [Hansch C; 1972], aunque no hay datos específicos sobre la toxicidad de los derivados halogenados de los parabenos.

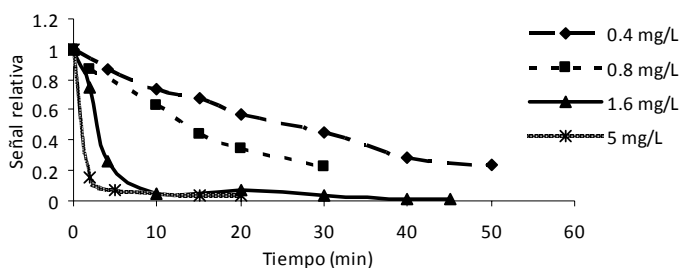
Tabla III.18. Relación entre las áreas de pico para los derivados halogenados de los parabenes en agua ultrapura con 0.4 mg/L de cloro libre y distintos contenidos de bromuro.

Compuesto	Relación áreas	Concentración inicial de bromuro (ng/mL)		
		1	10	65
MeP	3-ClMeP/3-BrMeP	2.19	0.13	<10 ⁻⁵
	3,5-DClMeP/3,5-DBrMeP	9.67	0.02	2.3 x 10 ⁻⁴
EtP	3-ClEtP/3-BrEtP	2.51	0.16	<10 ⁻⁵
	3,5-DClEtP/3,5-DBrEtP	10.32	0.02	<10 ⁻⁵
PrP	3-ClPrP/3-BrPrP	2.43	0.12	<10 ⁻⁵
	3,5-DClPrP/3,5-DPrMeP	12.72	0.02	1.7 x 10 ⁻⁴
BuP	3-ClBuP/3-BrBuP	2.71	0.15	<10 ⁻⁵
	3,5-DClBuP/3,5-DBrBuP	10.53	0.02	<10 ⁻⁵

3.6.5. Evolución temporal de los derivados clorados de los parabenes

La estabilidad de los compuestos estudiados, tanto los de partida como los derivados halogenados, fue estudiada para varias concentraciones de cloro libre (0.4, 0.8, 1.6 y 5 mg/L). En la figura III.31 se muestra la estabilidad del EtP para esas concentraciones de cloro y tiempos de reacción relativamente bajos.

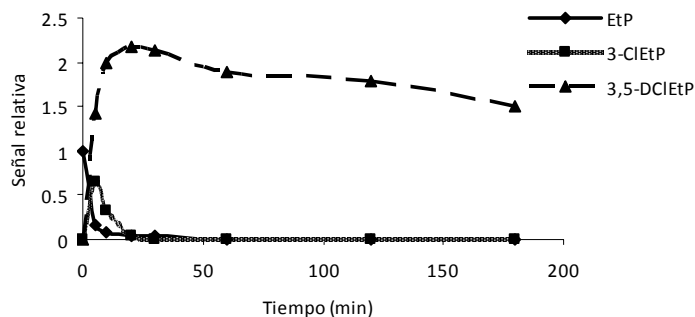
Figura III.31. Estabilidad temporal del EtP en agua ultrapura con distintas concentraciones de cloro libre. Concentración inicial de EtP 10 ng/mL.



Como se puede observar en la figura, a concentraciones elevadas de cloro libre en el medio de reacción, el decaimiento de la señal del compuesto de partida es más rápido, tal como ya había sido descrito en la sección 3.6.2. La evolución temporal de los compuestos halogenados se estudió a concentraciones elevadas de cloro libre (5 mg/L) y a tiempos comprendidos entre 0 y 180 minutos. En la figura III.32, se puede observar esta evolución para los derivados clorados del etilparaben en agua a pH 7.3. La especie predominante a tiempos de reacción largos es el 3,5-DClEtP, lo que demuestra su escasa labilidad frente a sucesivas cloraciones o rupturas del anillo aromático a

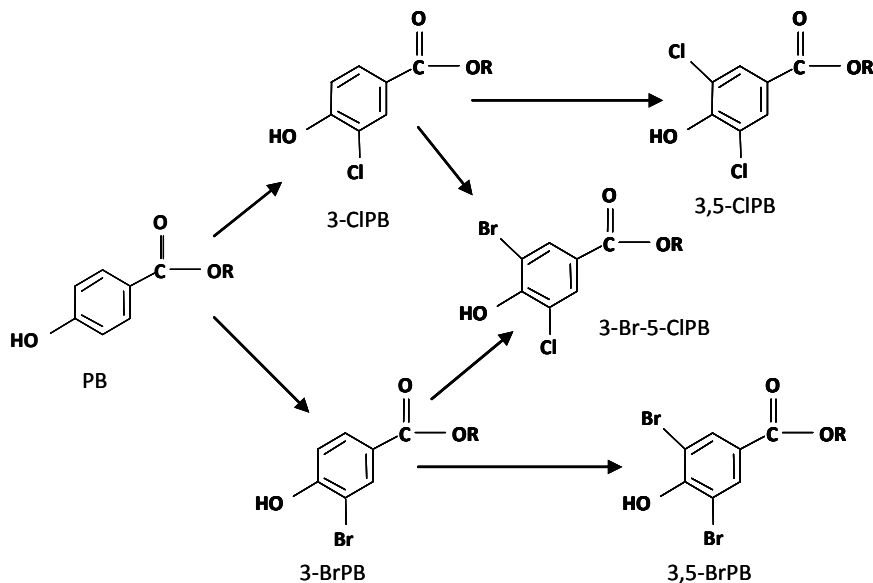
diferencia de lo que ocurría en el caso del triclosán. El resto de parabenos presentó un comportamiento análogo.

Figura III.32. Evolución temporal de los derivados clorados del EtP en agua ultrapura a pH 7.3, con 5 mg/L de cloro libre y 10 ng/mL de EtP iniciales.



En base a la información expuesta anteriormente la ruta de halogenación de los parabenos resulta extraordinariamente sencilla, figura III.33.

Figura III.33. Ruta de la halogenación de los parabenos en muestras de agua con cloro libre y trazas de bromuro.



3.6.6. Formación de derivados halogenados de los parabenos en agua de grifo en contacto con productos de cuidado personal

Desde un punto de vista ecotoxicológico es relevante conocer si las reacciones de cloración y bromación descritas anteriormente pueden tener lugar cuando productos de cuidado personal, que contienen en su formulación parabenos, se ponen en contacto con agua de grifo clorada. En esta situación, el cloro disponible puede ser consumido por otros aditivos incluidos en la formulación de los PPCPs, de modo que los parabenos permanecerían inalterados. Para llevar a cabo estos estudios, se empleó un gel de baño (tabla III.19), comprado en el supermercado. En todos los experimentos se utilizaron 250 mL de agua, ya sea agua ultrapura, de grifo o de piscina, a la cual se le adicionó este gel de baño de modo que la concentración final de los compuestos fue la indicada en la tabla III.19.

Tabla III.19. Concentraciones de los parabenos en el gel de baño comercial y en las muestras de agua.

	MeP	EtP	PrP	BuP
<i>Gel (mg/kg)</i>	2240	446	272	617
<i>Agua (ng/mL)</i>	22.4	4.5	2.7	6.2

En un primer ensayo, se añadió el gel de baño a un agua de piscina con 0.58 mg/L de cloro libre. Bajo estas condiciones, se obtuvieron los tiempos de vida media para los parabenos presentes en el producto cosmético que se indican en la tabla III.20, además se identificaron los mismos derivados halogenados encontrados en los experimentos realizados con patrones de estos compuestos.

Tabla III.20. Tiempos de vida media (minutos) obtenidos al mezclar un gel de baño con agua de piscina conteniendo 0.58 mg/L de cloro libre.

$t_{1/2}$ (min)			
MeP	EtP	PrP	BuP
18.0	10.7	11.4	10.6

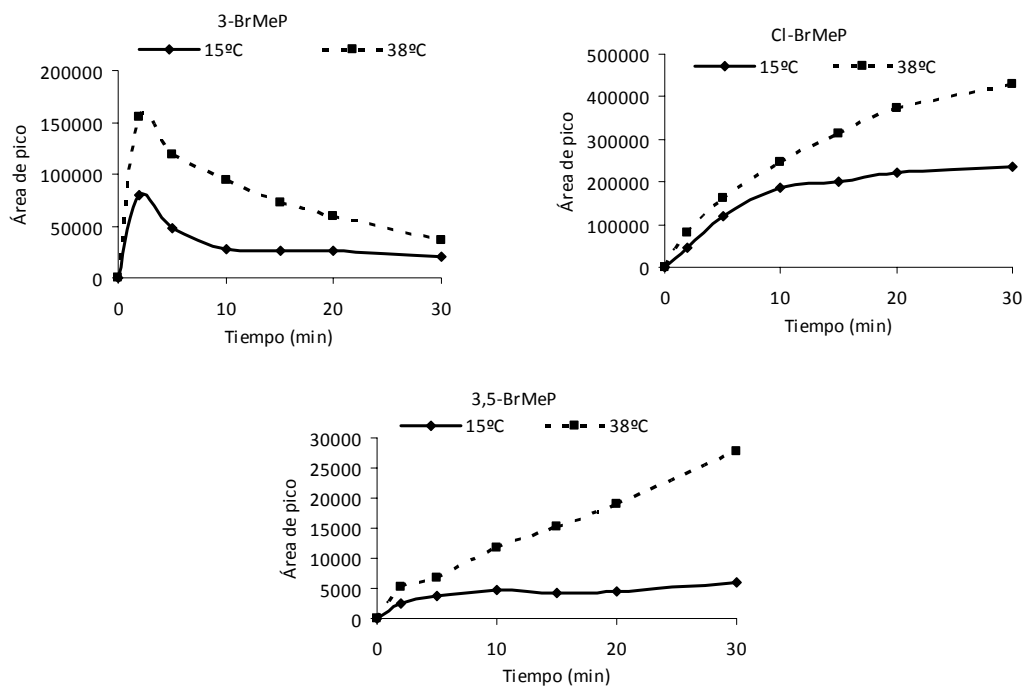
Para este mismo gel, se estudió la cinética de degradación en agua de grifo (0.83 mg/L de cloro libre) termostatazada a 15 y 38 °C. Los tiempos de vida media obtenidas se resumen en la tabla III.21.

Tabla III.21. Comparativa de tiempos de vida media (minutos) a 15°C y 38°C para los parabenos presentes en un gel de baño en contacto con agua de grifo conteniendo 0.83 mg/L de cloro libre.

Temperatura (°C)	$t_{1/2}$ (min)			
	MeP	EtP	PrP	BuP
15°C	11.6	9.8	9.3	8.6
38°C	7.8	5.8	5.4	4.9

A 38°C, el tiempo de vida media disminuyó prácticamente 1.5 veces con respecto a las pruebas realizadas a 15°C. Por otra parte, tal como se pone de manifiesto en la figura III.34, se apreció un incremento de las respuestas medidas para las sustancias bromadas frente a las cloradas cuando la temperatura del agua aumenta de 15°C a 38°C. En todo caso, estos compuestos fueron minoritarios con respecto a los derivados clorados.

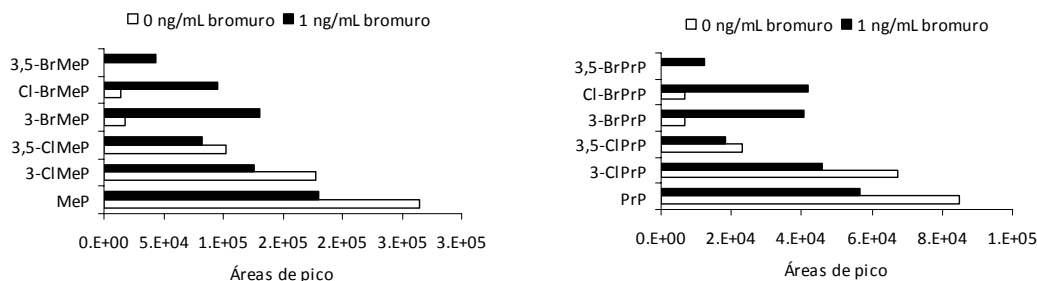
Figura III.34. Comparación de la evolución temporal de los derivados bromados del MeP a 15°C y 38°C. Datos para agua de grifo (0.83 mg/L cloro libre) y un gel de baño.



Por último, se evaluó la influencia del bromuro en la formación de derivados halogenados de los parabenos al mezclar agua de grifo con un colutorio bucal (concentración de MeP de 1225 mg/L y de PrP de 489 mg/L). Se llevaron a cabo dos ensayos añadiendo 25 μ L de una dilución 1:10 del colutorio sobre 250 mL de agua de grifo conteniendo 0.77 mg/L de cloro libre. A una de las muestras se le añadió también 1 ng/mL de bromuro como KBr. El tiempo de reacción considerado con ambos ensayos fue de 10 minutos.

Al igual que sucedió con las muestras de agua ultrapura, la formación de los compuestos bromados se hizo más significativa al añadir la sal (KBr) al medio acuoso, figura III.35.

Figura III.35. Influencia de la adición de 1 ng/mL de bromuro en la formación de los derivados halogenados para el MeP y el PrP a partir de un colutorio bucal. Agua de grifo (0.77 mg/L de cloro libre) a pH 7.3, tiempo de reacción de 10 minutos.



3.6.7. Presencia de parabenos halogenados en muestras reales

Los derivados dihalogenados procedentes de los parabenos presentan una gran estabilidad en medio acuoso (figura III.32). Además, los estudios realizados sobre la reactividad de productos de cuidado personal, que contiene en su formulación los parabenos, en agua de grifo y de piscina, pusieron de manifiesto que el comportamiento descrito para analitos puros puede producirse diariamente en cualquier hogar, implicando una continua introducción de estos compuestos en el agua residual. Se analizaron varias muestras de agua residual, sin tratar, en las cuales se determinó la concentración del paraben de partida así como la relación existente entre éste y los compuestos halogenados detectados en las muestras. Los resultados obtenidos para MeP y PrP se muestran en la tabla III.22.

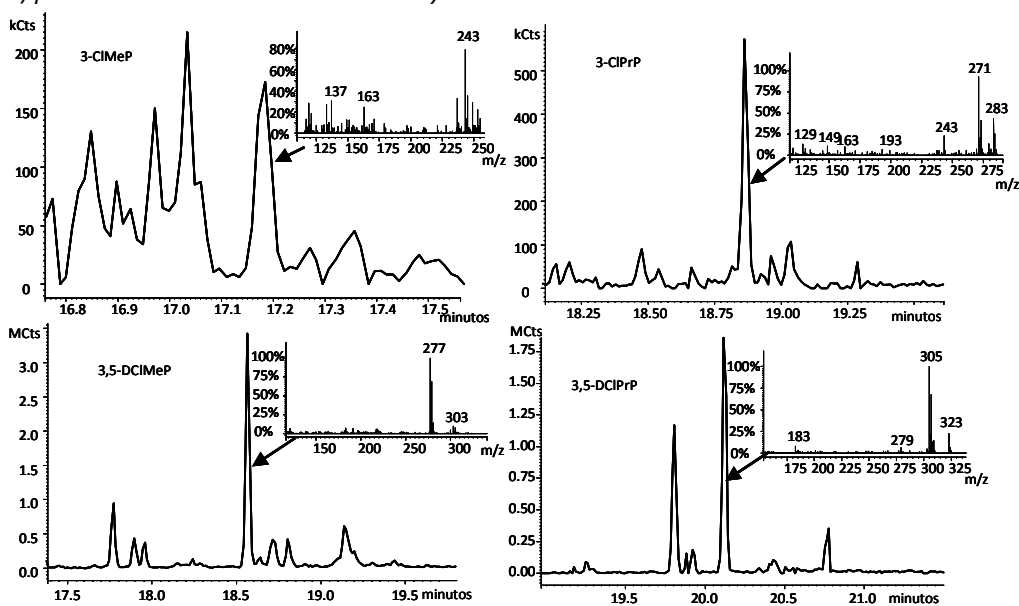
Tabla III.22. Concentraciones de MeP y PrP y relaciones de áreas de pico medidas para los compuestos halogenados detectados en agua residual (500 mL muestra).

Cod	Concentración ($\mu\text{g/L} \pm \text{SD}$)		Relación área de pico (%)			
	MeP	PrP	3-ClMeP/MeP	3,5-DClMeP/MeP	3-ClPrP/PrP	3,5-DClPrP/PrP
1	nd	0.98 \pm 0.09	nd	nd	nd	18.4
2	0.06 \pm 0.01	10.84 \pm 0.64	14.0	520.7	4.9	6.6
3	0.49 \pm 0.05	12.96 \pm 0.65	nd	323.0	nd	15.9
4	nd	0.94 \pm 0.08	nd	nd	nd	32.0
5	1.88 \pm 0.12	0.67 \pm 0.06	4.8	4.2	3.8	3.4

nd: por debajo de los LOQ

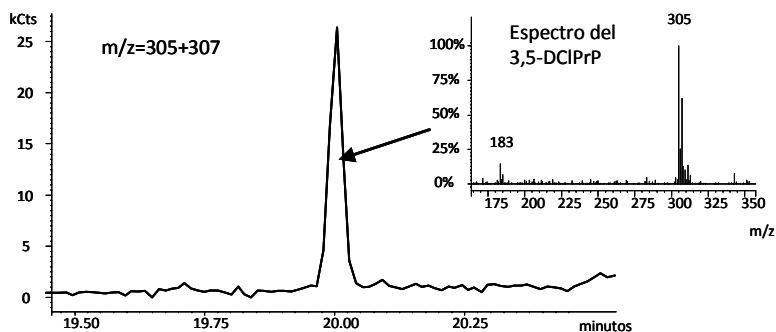
Tal como se observa en la tabla anterior, dos de las muestras (códigos 2 y 3) presentan respuestas para 3,5-DClMeP muy superiores a las del MeP, mientras que en las muestras número 2 y 5 se detectó también el 3-ClMeP. Para el PrP también se encontraron las formas mono y dicloradas. Para el BuP y EtP, compuestos utilizados minoritariamente en las formulaciones de PPCPs, no se detectaron los correspondientes derivados halogenados. En la figura III.36, se pueden observar los cromatogramas, con sus respectivos espectros de masas, para los derivados halogenados presentes en la muestra 2.

Figura III.36. Cromatogramas correspondientes a una muestra de agua residual (código 2, tabla III.22) para los derivados clorados del MeP y PrP.



La presencia de estos compuestos halogenados en agua residual puede justificarse únicamente debido a la cloración de parabenos, puesto que no hay ningún producto comercial de uso cotidiano que los contenga en su formulación, de modo que su identificación en agua residual sirve para poner de manifiesto la evidencia de las reacciones de transformación descritas. Otra evidencia de la formación de estos subproductos halogenados, fue la presencia del 3,5-DCIPrP en un agua de piscina con un contenido en cloro libre de 0.78 mg/L y un pH de 7.3. El cromatograma correspondiente se muestra en la figura III.37.

Figura III.37. Cromatograma correspondiente a una muestra de agua de piscina procesada mediante SPE (500 mL de muestra).



IV. APLICACIÓN DE LAS METODOLOGÍAS DESARROLLADAS A LA DETERMINACIÓN DE TRICLOSÁN, COMPUESTOS RELACIONADOS Y PARABENOS EN AGUAS RESIDUALES Y SUPERFICIALES

4.1. Triclosán y compuestos relacionados

Las metodologías de extracción y microextracción en fase sólida, desarrolladas para la determinación de triclosán, metiltriclosán y clorofenoles, fueron aplicadas a varias muestras de agua residual. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla IV.1, indicando el tipo de muestra, el modo de muestreo y la técnica de concentración empleada. Todas las muestras se procesaron por triplicado, utilizando como técnica de determinación GC-MS. Los especímenes de agua residual fueron tomados en distintos puntos de la red de alcantarillado, así como en la entrada (influyente) y salida (efluente) de una planta depuradora de aguas residuales urbanas, equipada con tratamientos primario y secundario (lodos activos). Las muestras compuestas corresponden a muestreos realizados durante un período de 12 horas, tomando una alícuota de agua cada 60 minutos. Puesto que en el apartado anterior se ha demostrado que el triclorofenol relacionado con la degradación del triclosán es el isómero 2,4,6- y no el 2,3,4-TCF, como se pensaba inicialmente, las metodologías de SPME y SPE, validadas para el último compuesto, se aplicaron a la determinación de ambas especies en muchas de las muestras procesadas. Los niveles medidos para triclosán fueron análogos a los encontrados por varios autores en Estados Unidos, Europa y Asia (tabla I.2 del capítulo I), aunque inferiores a los publicados por Agüera y colaboradores para muestras tomadas en España [Agüera A; 2003].

Tabla IV.1. Concentraciones cuantificadas de TCS, 2,4-DCF y 2,4,6-TCF en muestras de agua.

Código muestra	Tipo de agua y modo de muestreo	Técnica extracción	Concentración (ng/L)		
			2,4-DCF	2,4,6-TCF	TCS
1	Efluente compuesta	SPME (PA)	183±18	na	729±43
1	Efluente compuesta	SPE	163±17	na	690±35
2	Influyente puntual	SPME (PA)	144±11	na	242±18
2	Influyente puntual	SPME (PDMS-DVB)	151±17	na	229±40
3	Sin tratar compuesta	SPME (PA)	94±5	na	190±31
4	Sin tratar puntual	SPME (PDMS-DVB)	842±250	254±37	2000±440
5	Influyente compuesta	SPME (PA)	nd	na	433±52
6	Efluente compuesta	SPME (PA)	nd	na	209±22
7	Sin tratar compuesta	SPME (PA)	160±9	na	382±26

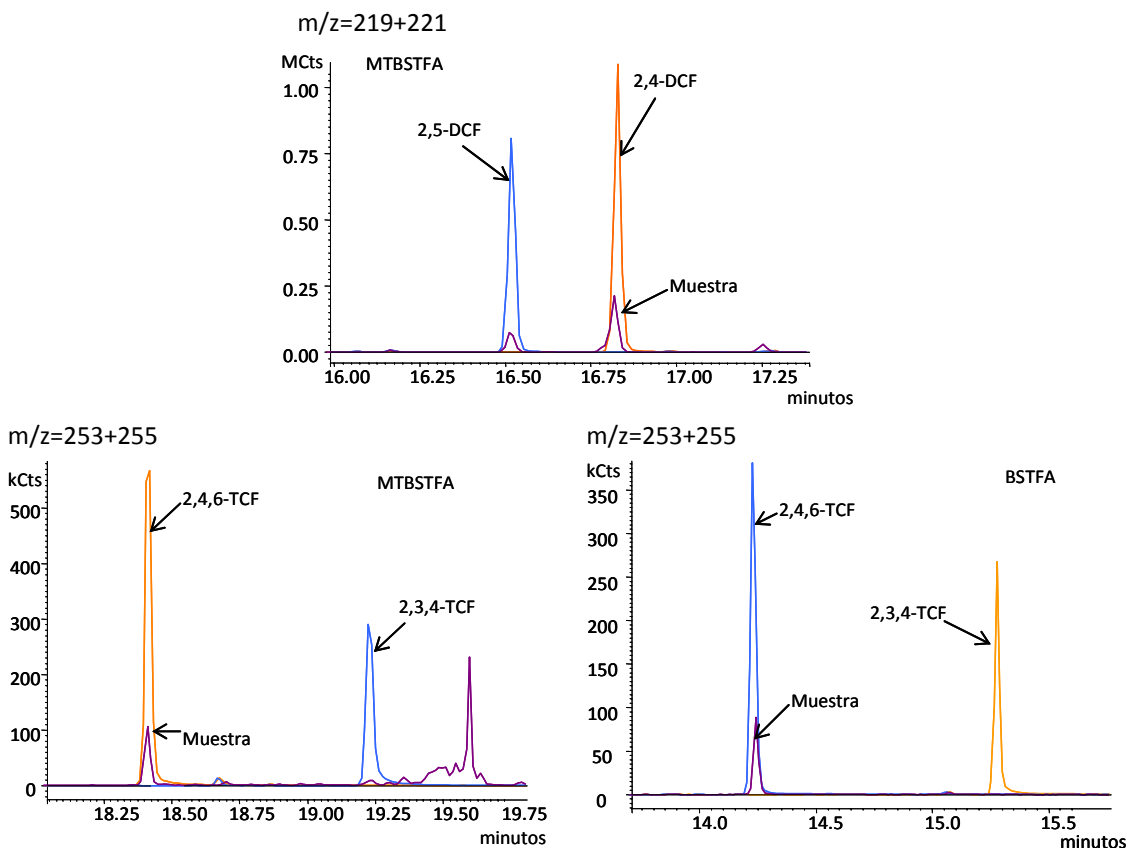
Determinación y reactividad en agua

Código muestra	Tipo de agua y modo de muestreo	Técnica extracción	Concentración (ng/L)		
			2,4-DCF	2,4,6-TCF	TCS
8	Sin tratar compuesta	SPME (PA)	2222±277	375±16	13944±1760
9	Influyente compuesta	SPME (PA)	54±5	na	966±164
10	Efluente compuesta	SPME (PA)	348±27	na	321±40
11	Sin tratar compuesta	SPE	95±1	na	209±10
12	Sin tratar compuesta	SPE	1306±13	na	1271±17
13	Influyente compuesta	SPE	272±1	32±3	250±16
14	Efluente compuesta	SPE	nd	78±10	43±15
15	Sin tratar compuesta	SPE	100±8	na	548±36
16	Sin tratar compuesta	SPE	813±28	390±12	3450±103
17	Influyente compuesta	SPE	289±5	223±14	333±12
18	Efluente compuesta	SPE	45±31	119±4	102±2
19	Sin tratar compuesta	SPE	164±12	106±20	268±13
20	Influyente compuesta	SPE	52±2	44±2	243±1
21	Efluente compuesta	SPE	nd	25±4	52±10
22	Sin tratar compuesta	SPE	219±10	110±3	414±11
23	Influyente compuesta	SPE	98±4	22±4	102±3
24	Efluente compuesta	SPE	43±6	68±6	78±8
25	Río puntual	SPE	nd	nd	80±10
26	Influyente puntual	SPE	nd	43±2	806±24
27	Efluente puntual	SPE	nd	37±3	728±76
28	Sin tratar puntual	SPME (PA)	171±13	na	70±9
29	Sin tratar compuesta	SPME (PA)	35±3	na	121±12
30	Sin tratar compuesta	SPME (PA)	1223±75	860±116	4148±423
31	Sin tratar compuesta	SPME (PA)	633±3	990±80	13605±538
32	Sin tratar compuesta	SPME (PA)	1282±32	247±6	17550±1176
33	Influyente puntual	SPME (PA)	58±6	na	299±8
34	Efluente puntual	SPME (PA)	54±2	na	265±26
35	Efluente puntual	SPME (PA)	29±5	na	186±21
36	Efluente puntual	SPME (PDMS-DVB)	89±14	na	165±15

na: no analizado nd: por debajo de los LOQ

En las muestras procesadas no se detectó nunca ni 2,3,4-TCF ni MTCS. Sin embargo, el TCS estuvo presente en el 100 % de las mismas. Con respecto al 2,4-diclorofenol, se cuantificó en la práctica mayoría de las muestras, con un porcentaje de positivos del orden del 80 %. El 2,4,6-TCF fue encontrado en el 95 % de la muestras en las que fue analizado. En algunas muestras, se detectó, a tiempos de retención inferiores al del 2,4-diclorofenol, otro pico con un espectro de masas idéntico. Para verificar la identidad de los picos asignados a 2,4-DCF y 2,4,6-TCF, en las muestras de agua, así como identificar el diclorofenol presente en algunas de ellas, se inyectaron patrones individuales de diferentes dicloro y triclorofenoles sililados empleando MTBSTFA y BSTFA. Los extractos de las muestras también se derivatizaron con ambos reactivos, figura IV.1.

Figura IV.1. Cromatogramas superpuestos para patrones y extractos de una muestra real (código 17, tabla IV.1) derivatizados con MTBSTFA y BSTFA.



Como se indicó anteriormente, el 2,4,6-TCF presenta el mismo tiempo de retención que el 2,4,5-TCF y el 2,3,5-TCF como derivados tert-butildimetilsililados (tabla III.13), aunque las 3 especies se pueden resolver cuando se utiliza el BSTFA, lo que ha permitido comprobar que el triclorofenol identificado de forma sistemática en las muestras analizadas es el 2,4,6-TCF. Además, ambos derivatizantes dan lugar a picos perfectamente resueltos para los isómeros 2,3,4- y 2,4,6-TCF de manera que no existe riesgo de realizar asignaciones erróneas entre ambas especies (fig. IV.1). El diclorofenol que aparece en algunos de los extractos, a tiempos de retención inferiores al 2,4-DCF, se identificó como el 2,5-DCF. En principio, no existe ninguna relación entre este compuesto y el TCS.

Las mayores concentraciones de 2,4-DCF y 2,4,6-TCF se detectaron en aquellas muestras que presentaron niveles elevados de triclosán (4, 8, 12, 16, 30, 31 y 32) lo que ratifica la hipótesis de que estos compuestos procedan, al menos en parte, de la cloración del TCS, cuando PPCPs conteniendo este bactericida entran en contacto con el agua clorada. La muestra número 25 es la única correspondiente a agua de río en la tabla IV.1. Ha sido tomada unos 5 Km después del punto de descarga de las aguas residuales procedentes de la estación depuradora. Ese mismo día se han obtenido también las muestras número 26 y 27, correspondientes al influente y el efluente de la planta. El nivel de TCS en el río representa del orden de un 10 % de su concentración en el efluente de la estación depuradora.

Usando los datos para los pares de muestras compuestas de agua residual, tomadas a la entrada y salida de la planta depuradora (5-6, 9-10, 13-14, 17-18, 20-21 y 23-24), se estimaron los porcentajes de eliminación del TCS, 2,4-DCF y 2,4,6-TCF, en lo referente a las fracciones presentes en disolución, tabla IV.2. Cabe destacar que estos pares de muestras fueron tomados con una diferencia de 12 horas, equivalentes al tiempo de residencia del agua en la planta. Los porcentajes de eliminación promedio oscilan entre el 45 y el 68 %, sin embargo para TCS y 2,4-DCF se observaron variaciones muy importantes en la eficacia de la planta depuradora.

Tabla IV.2. Porcentaje de eliminación de triclosán, 2,4-DCF y 2,4,6-TCF para las muestras tomadas a la entrada y a la salida de la depuradora de agua residual.

Código muestra	2,4-DCF	2,4,6-TCF	TCS
5-6	0 %	na	52 %
9-10	0 %	na	67 %
13-14	100 %	nc	83 %
17-18	84 %	47%	69 %

Código muestra	2,4-DCF	2,4,6-TCF	TCS
20-21	100 %	43%	79 %
23-24	56 %	nc	24 %
<i>Eliminación media</i>	68 ± 62	45 ± 6	62 ± 35

na: no analizado

nc: porcentajes negativos no considerados para el cálculo

Con objeto de verificar la exactitud de las metodologías de SPE y SPME con muestras contaminadas de forma real, la muestra número 1 fue procesada con ambas técnicas (N=3) y los resultados obtenidos, para los dos compuestos que se encuentran por encima de los LOQs del método, comparados estadísticamente utilizando los tests F de Fisher y t de Student, tabla IV.3. La conclusión a la que se llegó es que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones obtenidas con ambas metodologías, tabla IV.4. De forma análoga, la muestra número 2 se concentró mediante SPME, empleando fibras de PA y PDMS-DVB. De nuevo, las concentraciones encontradas para 2,4-DCF y TCS, empleando ambas fibras, fueron equivalentes para un nivel de confianza del 95 %.

Tabla IV.3. Expresiones para el test F y el test t de Student.

Test	Fórmula
F	$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad s_1 > s_2$
t de Student (varianzas comparables estadísticamente, test F)	$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s \sqrt{\frac{n_2 + n_1}{n_1 n_2}}} \quad s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$

Tabla IV.4. Valores de F y t de Student tabulados y calculados para ambos métodos de extracción, muestra 1.

	F experimental	F tabulada	t experimental	t tabulada	Conclusión
2,4-DCF	1.10	39	1.36	2.78	Resultados comparables (95% confianza)
TCS	1.50	39	1.21	2.78	Resultados comparables (95% confianza)

Tabla IV.5. Valores de F y t de Student tabulados y calculados para ambas fibras de SPME, muestra 2.

	F experimental	F tabulada	t experimental	t tabulada	Conclusión
2,4-DCF	2.38	39	0.59	2.78	Resultados comparables (95% confianza)
TCS	4.90	39	0.51	2.78	Resultados comparables (95% confianza)

4.2. Parabenes

La presencia de parabenes se investigó en muestras de agua de río y agua residual. En el primer caso se realizaron muestreos puntuales en la zona de Pontevedra, Lugo y Santiago de Compostela (Ver Anexo, página 187-188, para la localización de las muestras). Todas las muestras fueron procesadas por triplicado, utilizando la técnica de extracción en fase sólida. En algunos casos se incrementó el volumen de muestra concentrado hasta 2 L, en lugar de 1 L, y el extracto final se concentró a un volumen de 0.5 mL con objeto de reducir los límites de cuantificación presentados en la tabla III.11 en un factor de 8 veces. Además se realizaron blancos de muestreo y de extracción, para detectar posibles problemas de contaminación ambiental o del material.

Los valores encontrados para 10 muestras de agua se presentan en la tabla IV.6. MeP y PrP estuvieron presentes en todas las muestras, mientras que el BzP no se detectó en ninguna de ellas. Las muestras codificadas como 1, 2, 3 y 4 fueron tomadas en los alrededores de Santiago de Compostela. Las dos primeras corresponden al río Sar, tomadas previa (muestra 1) y posteriormente (muestra 2) al punto de vertido del efluente de la planta depuradora de agua residual. La muestra 3 corresponde a un afluente del Sar. Como podemos comprobar, las muestras 1 y 3 presentan niveles bajos de los parabenes, mientras que en la muestra 2, se observó un nivel superior de PrP (100 ng/L). Las muestras codificadas como 6 y 7 son de un río de Pontevedra (Lérez) y dos de sus afluentes (códigos 5 y 8). Todas ellas presentaron niveles similares de MeP y PrP.

Las muestras número 9 y 10 corresponden a ríos cuyo cauce transcurre por dos ciudades, una de las cuales (Vigo, código 9) presenta una gran industrialización así como un elevado número de habitantes (400 000 habitantes), mientras que la otra procede de una pequeña ciudad interior de la zona de Lugo (código 10).

Tabla IV.6. Concentración de parabenes en muestras de agua de río (ng/L). N=3 réplicas.

Código muestra	Localización	Muestreo	Concentración (ng/L)				
			MeP	EtP	PrP	BuP	BzP
1	Lat: 42°52'10.54"N Lon: 8°34'43.12"O	18/01/06	27±3	5.4±0.1	29±2	19±1	nd
2	Lat: 42°51'36.06"N Lon: 8°37'15.11"O	18/01/06	26±3	7.1±0.4	102±2	nd	nd
3	Lat: 42°53'7.12"N Lon: 8°34'20.31"O	18/01/06	5.4±0.8	3.3±0.1	14±2	20±1	nd
4	Lat: 42°50'5.90"N Lon: 8°35'8.11"O	27/02/06	17±1	nd	14±2	nd	nd
5	Lat: 42°26'57.14"N Lon: 8°38'40.32"O	27/02/06	7.3±0.3	nd	8.3±0.7	nd	nd
6	Lat: 42°26'3.16"N Lon: 8°38'9.04"O	28/02/06	13±1	nd	15±1	nd	nd
7	Lat: 42°27'6.89"N Lon: 8°37'18.33"O	28/02/06	15±2	nd	21±3	nd	nd
8	Lat: 42°25'8.71"N Lon: 8°38'11.84"O	27/02/06	18±1	nd	20±1	1.4±0.1	nd
9	Lat: 42°13'1.25"N Lon: 8°42'32.64"O	28/02/06	13±1	nd	34±3	nd	nd
10	Lat: 42°36'22.95"N Lon: 7°46'36.14"O	01/02/06	12±1	nd	18±3	nd	nd

nd: por debajo de los LOQ

Las muestras de agua residual, salvo indicación contraria, han sido integradas durante un periodo de 12 horas y se procesaron utilizando tanto SPE como SPME. En el primer caso, la cuantificación se realizó mediante calibración externa y en el segundo haciendo adiciones al agua. La figura IV.3 muestra los cromatogramas para un blanco de SPME, una muestra de agua residual y la misma matriz fortificada con los analitos de interés. Los datos de concentración para las muestras medidas se recogen en la tabla IV.7. Las muestras codificadas como 1, 2, 3, 4, 9, 12 y 16, corresponden a distintos puntos de la red de alcantarillado en la ciudad de Santiago. Al igual que ocurría en el agua de río, MeP y PrP fueron las especies presentes a mayor concentración, mientras que no se ha detectado el BzP en ninguna de ellas.

Figura IV.2. Cromatogramas de GC-MS/MS para un blanco del proceso (rojo), una muestra de influente (verde, código 7, tabla IV.7) y la misma muestra fortificada a 0.5 ng/mL (naranja).

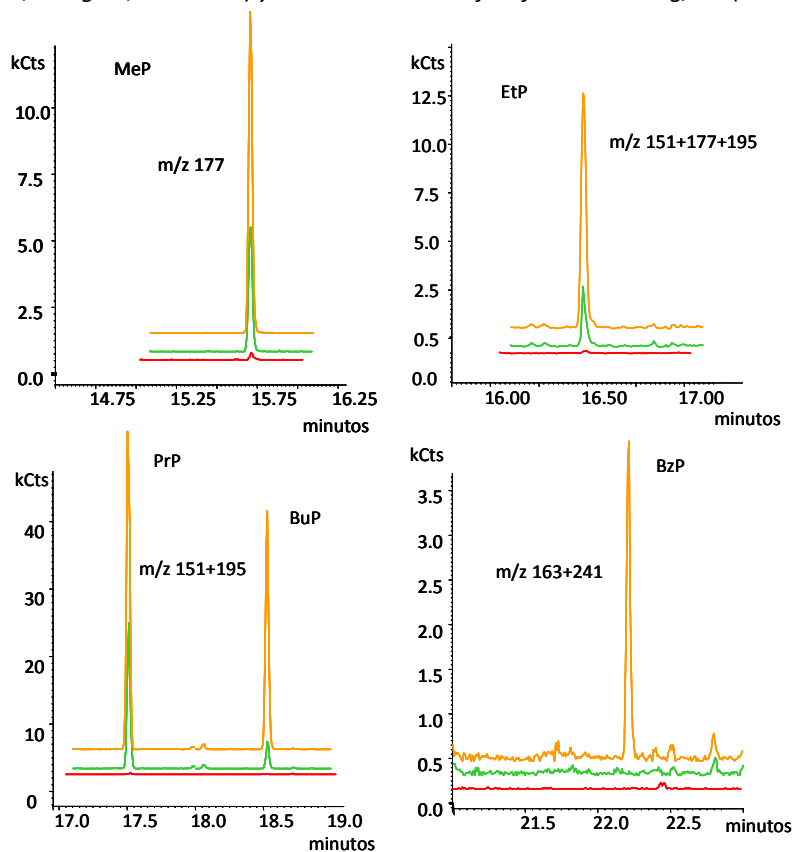


Tabla IV.7. Cuantificación de parabenos en muestras de agua residual mediante las metodologías de SPE y SPME. Concentración en ng/L (N=3).

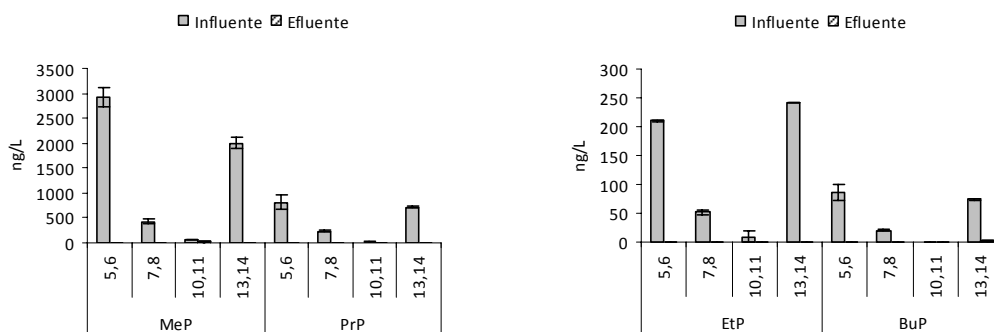
Cod.	Tipo de agua y modo de muestreo	Técnica de concentración	Concentración (ng/L)			
			MeP	EtP	PrP	BuP
1	Sin tratar	SPME	2400±190	nd	980±100	nd
2	Sin tratar	SPME	65±8	56±6	810±70	nd
3	Sin tratar	SPME	73±3	nd	180±30	nd
4	Sin tratar	SPME	1480±170	10±1	1220±110	19±1

Cod.	Tipo de agua y modo de muestreo	Técnica de concentración	Concentración (ng/L)			
			MeP	EtP	PrP	BuP
5	Influente	SPME	2920±200	210±10	810±140	86±15
6	Efluente	SPME	nd	nd	nd	nd
7	Influente	SPME	430±40	52±4	230±20	20±1
8	Efluente	SPME	nd	nd	nd	nd
9	Sin tratar	SPE	65±1	56±1	807±23	nd
10	Influente	SPE	53±2	9±1	16±1	nd
11	Efluente	SPE	18±1	1±1	7±1	nd
12	Sin tratar	SPE	1726±86	159±3	1294±60	20±3
13	Influente	SPE	2000±105	242±1	715±12	74±2
14	Efluente	SPE	8±1	nd	14±1	2±1
15	Influente ¹	SPE	166±7	116±4	431±22	40±1
16	Sin tratar ¹	SPE	2401±110	nd	978±35	nd

nd por debajo de los LOQ ¹ Muestras puntuales

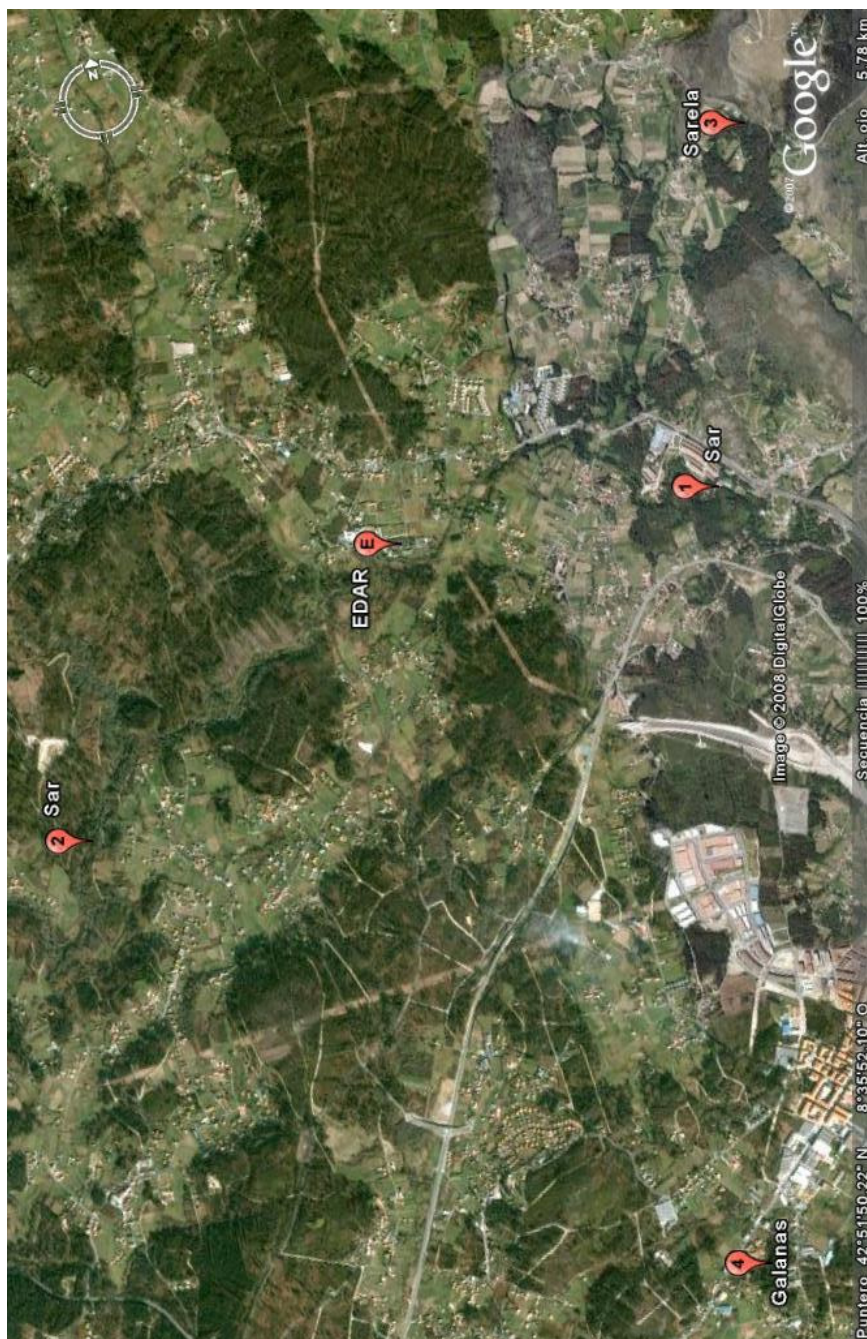
La figura IV.3 representa las concentraciones para las parejas de muestras 5-6, 7-8, 10-11 y 13-14, correspondientes a muestreos realizados en diferentes fechas en la entrada y salida de la estación depuradora, con una diferencia de 12 horas para tener en cuenta el tiempo de residencia del agua en la planta.

Figura IV.3. Niveles de parabenes en la entrada y salida de la estación depuradora de agua residual.



En conjunto, los parabenos son eliminados de manera prácticamente cuantitativa durante el tratamiento del agua residual, y sus niveles en efluente son del mismo orden, o incluso inferiores a los encontrados en las muestras de agua de río procesadas.

Anexo: Puntos de muestreo para la determinación de parabenes en ríos gallegos (tabla IV.6)







CAPÍTULO IV

I. DETERMINACIÓN DE TRICLOSÁN Y CLOROFENOLES EN MUESTRAS DE SEDIMENTO Y LODO MEDIANTE EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS

1.1. Introducción

En el capítulo III de esta Tesis Doctoral se ha puesto de manifiesto la presencia de triclosán y dos clorofenoles relacionados en aguas residuales. Dado que el triclosán tiene un carácter medianamente lipofílico ($\text{Log } K_{ow}$ 4.8), una parte del mismo puede permanecer asociado a los residuos sólidos (lodos) generados en las estaciones depuradoras de aguas residuales. En estas plantas se generan distintos tipos de lodos según el tipo de tratamiento aplicado. En el denominado tratamiento primario, se elimina la materia en suspensión presente en el agua mediante una serie de operaciones de tipo físico. Incluye la eliminación de gruesos, el desarenado, el desengrasado y la decantación, dando lugar al lodo denominado primario. En el tratamiento secundario se lleva a cabo el “ataque” a la fracción disuelta en agua, recurriendo a bacterias que se alimentan de la materia orgánica en disolución. Tras un nuevo proceso de decantación, se separa el lodo biológico o secundario. En algunas plantas depuradoras, se realiza además un tratamiento físico-químico (tratamiento terciario) para mejorar algunas de las características del efluente final.

Los lodos generados en la planta depuradora procedentes del tratamiento primario y secundario, normalmente son reutilizados como fertilizantes, después de su tratamiento con agentes químicos (por ejemplo, cal viva o carbonato cálcico) para eliminar bacterias y otros microorganismos. Este uso, hace posible que los contaminantes químicos retenidos en la matriz sólida, pasen directamente al suelo [Xu J; 2008]. Por tanto, es importante conocer que compuestos permanecen en el lodo así como su concentración.

La determinación de compuestos orgánicos en matrices sólidas, y principalmente en lodos, presenta un grado de dificultad considerable. La complejidad de la matriz y la fuerte interacción existente entre los sitios activos del lodo y las moléculas de los analitos, hacen que las recuperaciones obtenidas sean generalmente bajas y sometidas a una gran variabilidad. Por lo tanto, es necesario la utilización de técnicas de extracción exhaustivas como Soxhlet [Bester K; 2003], extracción con disolventes presurizados [Singer H; 2002][Chu S; 2007][Agüera A; 2003], extracción con fluidos supercríticos [Mc Avoy DC; 2002] o extracción asistida por microondas [Morales S; 2005]. Por otro lado, debido a la gran capacidad de extracción de estas técnicas, no sólo recuperamos los compuestos de interés, si no que, una parte importante del contenido orgánico de estas muestras pasa a disolución por lo que se obtienen extractos muy complejos que no pueden ser analizados directamente y precisan de una etapa de purificación. En la tabla I.1 se resumen varios métodos desarrollados para la determinación de triclosán en muestras de lodo y sedimentos. Cabe destacar que en ninguna de las referencias se hace mención a la extracción simultánea de triclosán y

los clorofenoles derivados de la halogenación de este bactericida: 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol.

Tabla I.1. Resumen de métodos para la determinación de Triclosán en muestras de lodos y sedimentos.

Analitos y matriz	Procedimiento	Detección	LOD (ng/g)	RSD (%)	Rec. (%)	Ref.
TCS y otros PPCPs en sedimentos marinos	Soxhlet asistido por microondas: 1 g de liofilizado y 100 mL de DCM durante 75 min. Evaporar a sequedad y reconstituir con AcOEt.	GC-MS	0.5	10	96	(1)
TCS y bifenilol en sedimentos marinos	PLE: 10 g de liofilizado+2 g hidromatrix en celdas de 22 mL. DCM, 100°C, 1500 psi, 1 ciclo de 5 min. Evaporar a 5 mL y purificación con 1 g de sílica, eluyendo con acetona y metanol. Concentrar a sequedad y reconstituir con fase móvil.	GC-MS LC-MS/MS	3.5	7	100	(2)
TCS en lodos de depuradora	Soxhlet: 10 g de liofilizado con AcOEt 6 h. Limpieza con sílica y purificación mediante cromatografía de permeación en gel.	GC-MS	4	27	94	(3)
TCS y MTCS en sedimentos y lodos de depuradora	PLE: 1 g liofilizado DCM, 100°C, 1500 psi, 3 ciclos de 5 min. Purificación con 2 g de sílica y elución con 2 mL de DCM, evaporando a sequedad. Derivatizar con diazometano. Eliminación de disolvente, reconstitución con AcOEt.	GC-MS/MS	1.5	3	95	(4)
TCS y TCC en lodos	PLE: 0.1-0.2 g de liofilizado, dispersado con 3 g de hidromatrix, DCM, 60°C, 1500 psi, 3 ciclos de 5 min. Purificar con Oasis HLB 500 mg, lavando con hexano, DCM y agua, eluir con MeOH:Acetona (1:1). Concentrar a sequedad y reconstituir con MeOH.	LC-MS/MS	1.5	6	98	(5)
TCS, nonilfenol y derivados, bisfenol A en lodos	Sonicación: 20 mg de lodo seco a 50°C con 5 mL de MeOH y 3 mL agua durante 30 min. Dilución con 100 mL agua ultrapura y SPE con C18. Elución con 8 mL DCM:Hexano (4:1). Concentrar a sequedad y derivatizar con BSTFA y piridina a 65°C/20 min.	GC-MS	150	15	85	(6)(7)
TCS, MTCS, Tetras y Pentaclosano en lodos	Extracción con fluidos supercríticos: 0.5 g de liofilizado + 0.5 g de sílica, 40°C, 5500 psi, 200 µL de ácido fórmico en estático 15 min y CO ₂ a 1 mL/min en dinámico 45 min. Trampa de C18 y extracción de la misma con hexano a 10-20°C, concentración a 0.5 mL y derivatizar con BSTFA.	GC-MS	--	21	79-84	(8)

Analitos y matriz	Procedimiento	Detección	LOD (ng/g)	RSD (%)	Rec. (%)	Ref.
TCS, AINEs, PPCPs en suelos	MAE: 3 g suelo seco a 115°C, 15 min a 800 W con 2:1 de DCM:MeOH. Dividir en 2 el extracto, derivatizando uno de ellos con BSTFA, y purificar ambos con sílica, eluyendo con distintos disolventes.	GC-MS	--	10	90	(9)
TCS y PPCPs en lodos de depuradora	PLE: 0.5 g liofilizado + material inerte en celdas de 33 mL. Extracción con AcOEt a 130°C, 2 ciclos de 45 min. Evaporar a 1 mL, y diluir 1:9 con tolueno.	GC-MS	31	--	70-130	(10)
TCS y PPCPs en lodos de depuradora	Extracción líquido-sólido: 0.5 g liofilizado con 30 mL de NaOH 1M, agitando a 700 rpm 30 min. Centrifugar a 3000 rpm 10 min. Ajuste de pH a 2. Añadir 20 mL tolueno, agitar a 700 rpm/30 min. LLE para obtención de la fase orgánica, y derivatización con agente sililante.	GC-MS	31	--	70-130	(10)
TCS y fármacos en lodos y suelos enriquecidos con lodos	PLE: 2.7 g suelo ó 1 g lodo liofilizado + arena en celdas de 33 mL. Extracción con MeOH:agua (1:1) a 60°C/1500 psi con 2 ciclos estáticos de 5 min. Concentración seguida de SPE Oasis HLB 200 mg.	LC-MS/MS	20	3.0-4.6	100	(11)

(1) Morales-Muñoz S, 2005; (2) Agüera A, 2003; (3) Bester K, 2003; (4) Singer H, 2002; (5) Chu S, 2007; (6) Gatidou G, 2007; (7) Stasinakis AS, 2008; (8) Mc Avoy DC, 2002; (9) Rice SL, 2007; (10) Ligon AP, 2008; (11) Barron L, 2008.

1.2. Experimentos previos

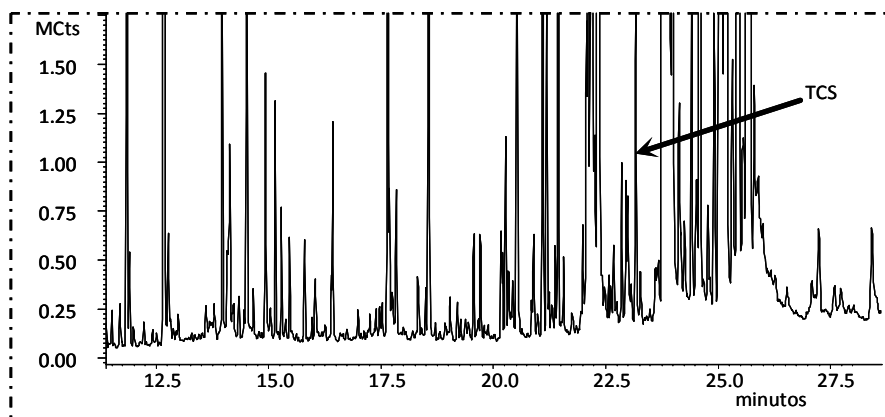
Para la extracción de triclosán, 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol de lodos de depuradora y sedimentos, se seleccionó la extracción asistida por microondas (MAE) puesto que presenta un gran poder extractante, derivado de la aplicación de la energía de microondas sobre una muestra impregnada con un disolvente que presenta un momento dipolar distinto de cero. Los extractos obtenidos, generalmente fueron complejos, de modo que, al igual que ocurre con los métodos descritos en la tabla I.1, es necesario establecer una estrategia de purificación para eliminar potenciales interferencias.

1.2.1. Viabilidad de la extracción de TCS, 2,4-DCF y 2,4,6-TCF de muestras de lodos mediante MAE

Previamente a la optimización de las condiciones de extracción, se llevaron a cabo una serie de pruebas iniciales para poner de manifiesto la presencia de los compuestos de interés en la matriz estudiada, así como el grado de complejidad de los extractos obtenidos.

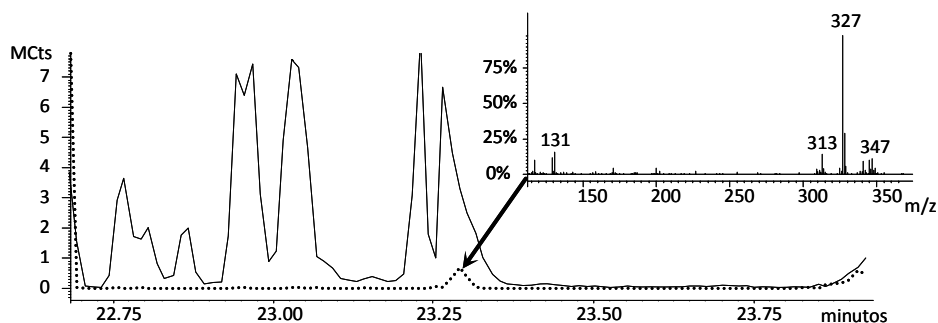
Las muestras de lodo sin adición, previamente liofilizadas, fueron extraídas con tres disolventes distintos: acetato de etilo, acetona y metanol, en base a la bibliografía existente para la determinación de triclosán y otros fármacos en esta matriz [Bester K; 2003][Ternes TA; 2005]. La extracción (0.5 g de muestra liofilizada) se realizó con 30 mL de disolvente a 110°C durante 20 minutos, con una potencia del magnetrón de 500 W. Una vez enfriados, los extractos fueron centrifugados y el sobrenadante fue recogido en un vial, realizando un cambio de disolvente a acetato de etilo. En todos los casos, los extractos presentaron un color muy intenso, con lo cual previamente a la inyección de los mismos en el sistema cromatográfico (GC-MS), se procedió a su purificación con 500 mg de sílica, eluyendo los analitos con acetato de etilo en las condiciones descritas en el capítulo anterior para muestras de agua. En la figura I.1 se muestra un cromatograma de GC-MS correspondiente a la extracción con acetona. Independientemente del disolvente de extracción, el perfil de corriente iónica total (TIC) presentó una gran complejidad debido al elevado número de impurezas co-extraídas, lo que repercute en que el tiempo de vida útil de la columna disminuya.

Figura I.1. Cromatograma de corriente iónica total para un extracto de lodo. MAE a 110°C con acetona.



Además de la gran complejidad de los cromatogramas de GC-MS, en el espectro de masas del triclosán se aprecia una señal a 327 unidades de m/z perteneciente a una interferencia que co-eluye con el analito y que dificulta su identificación, sobre todo para muestras con niveles bajos del compuesto. En la figura I.2 se observa la intensidad de la interferencia frente a la señal de TCS, así como el espectro de masas para el pico del triclosán en la muestra sin adición.

Figura I.2. Cromatograma correspondiente a una muestra de lodo primario reconstruido a m/z 327 (impureza, línea continua) y 345+347 (TCS, línea discontinua).



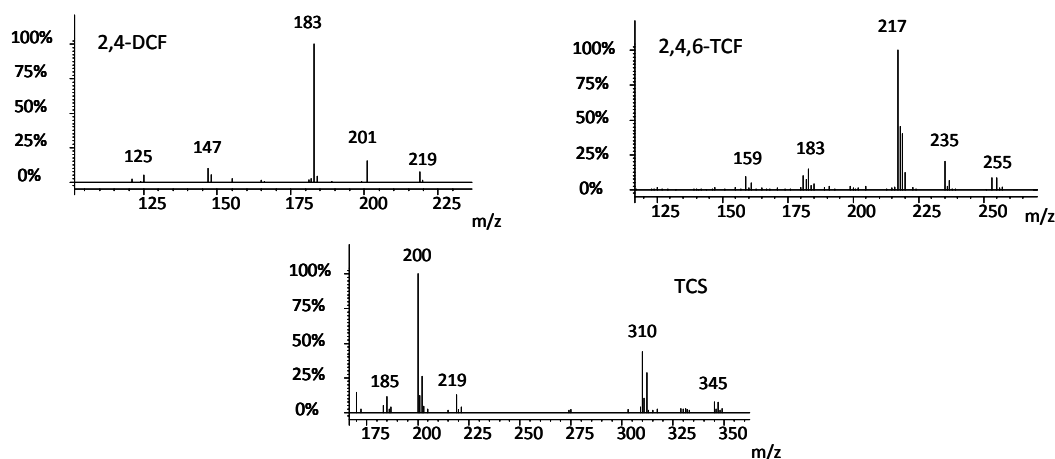
En base a estos datos preliminares, se decidió desarrollar una estrategia de purificación exhaustiva de los extractos obtenidos por microondas, además de optimizar la detección en modo MS/MS para aumentar la sensibilidad y la selectividad en la determinación de los compuestos de interés. Por otro lado, estos experimentos pusieron de manifiesto la existencia de concentraciones significativas de TCS en el lodo.

1.2.2. Identificación cromatográfica (GC-MS/MS)

La identificación de los picos cromatográficos correspondientes a TCS, 2,4-DCF y 2,4,6-TCF se llevó a cabo considerando sus tiempos de retención, así como los espectros de MS y MS/MS. Las condiciones de detección en modo MS fueron descritas en la sección III del capítulo anterior. La optimización de las condiciones de MS/MS para el 2,4-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol y triclosán se realizó con ayuda de la herramienta de desarrollo automatizado de métodos (AMD). Los iones precursores seleccionados fueron los fragmentos correspondientes a la pérdida del grupo tert-butilo de m/z $[M-57]^+$ para el 2,4-DCF y $[M+2-57]^+$ para el 2,4,6-TCF y el TCS. La elección del ión precursor $[M+2-57]^+$ para compuestos triclorados, da lugar a dos iones producto para cada transición que implica una pérdida de cloro. La ventana de aislamiento se fijó en 3 unidades de m/z , y se utilizó la fragmentación en modo resonante. En el caso de los clorofenoles, los espectros obtenidos mostraron la pérdida de 36 y 72 unidades de masa, correspondientes a la eliminación de uno o dos moléculas de HCl en la estructura de los analitos. Para el triclosán, la fragmentación resultó ser un poco más compleja, puesto que además de perder un átomo de Cl (transición 347 a 310), su enlace éter se rompe, dando lugar a un fragmento de 200 unidades de m/z .

En la figura I.3 se presentan los espectros de MS/MS obtenidos para 2,4-DCF, 2,4,6-TCF y TCS como compuestos tert-butildimetilsililados.

Figura I.3. Espectros de MS/MS para 2,4-DCF, 2,4,6-TCF y TCS.



Las condiciones instrumentales de medida en GC-MS/MS para TCS y dos clorofenoles se resumen en la tabla I.2.

Tabla I.2. Condiciones instrumentales de medida en GC-MS/MS.

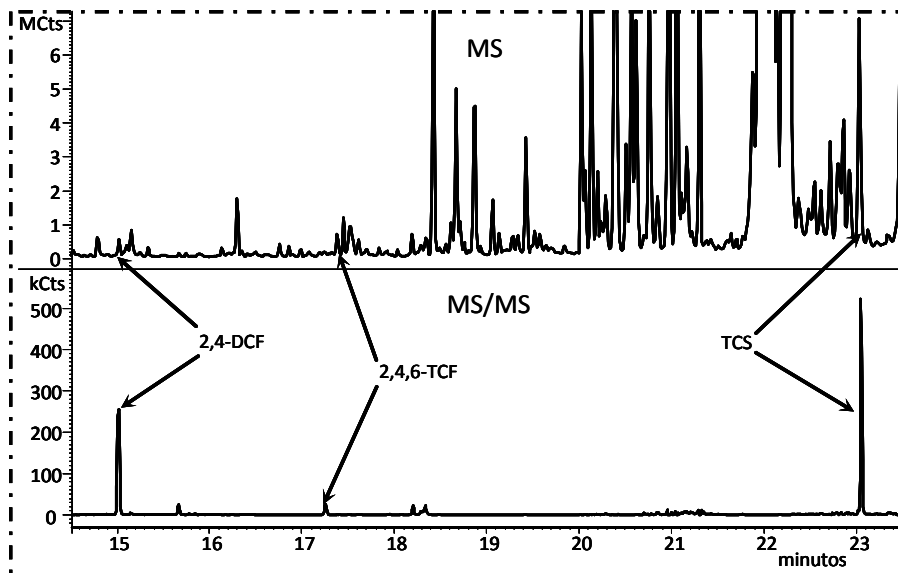
	Tr (min) ¹	Ión precursor (m/z)	Nivel de almacenamiento (m/z)	Amplitud de excitación (V)	Iones producto (m/z) ²	Intensidades relativas (%)
2,4-DCF	15.67	219	96	0.53	<u>183</u>	100
					147	10
2,4,6-TCF	17.26	255	110	1.10	<u>217</u>	100
					235	34
					183	15
TCS	23.04	347	140	1.50	<u>200</u>	100
					<u>310</u>	50
					219	10

¹Columna HP5-MS.

²Los iones subrayados se utilizan para cuantificación.

La siguiente figura, correspondiente a un extracto de un lodo biológico sin adición, pone de manifiesto la disminución de la complejidad del perfil cromatográfico cuando se utiliza MS/MS como técnica de detección frente a MS, figura I.4.

Figura 1.4. Cromatogramas (TIC) de MS y MS/MS correspondientes a un extracto de una muestra de lodo biológico.



1.3. Estrategia de purificación de los extractos

Tal como hemos descrito en las pruebas preliminares, los extractos de microondas correspondientes a muestras de lodo fueron muy complejos, conteniendo gran cantidad de interferencias. Aunque el uso de la detección en modo MS/MS “oculta” su presencia en los cromatogramas, es evidente que a medio plazo provocarán la contaminación irreversible de la columna capilar. Para reducir estos problemas, se desarrolló una estrategia de purificación de los extractos más elaborada, evitando siempre recurrir a la cromatografía de permeación en gel [Bester K; 2003].

Dado que los compuestos objeto de estudio, tienen características ácidas (pK_a comprendidos entre 6.6 y 8.1) pueden ser separados de especies de naturaleza básica y neutra utilizando extracción líquido-líquido. A pHs básicos, cabe esperar que en un proceso de extracción líquido-líquido tengan mayor afinidad por el medio acuoso que por la fase orgánica. Para evaluar la viabilidad de esta estrategia de purificación, se investigó la distribución de estos compuestos entre una fase orgánica y otra acuosa a pH básico. Para estas pruebas, se prepararon alícuotas de 100 mL de agua ultrapura con adición de los analitos a nivel de 50 ng/mL, ajustando el pH con hidróxido sódico a valores de 11.5 y 13 unidades. Estas muestras fueron extraídas con dos alícuotas de 15 mL

de hexano o acetato de etilo. La fase orgánica se concentró a 2 mL, y una alícuota de 500 µL fue derivatizada con MTBSTFA. La fase acuosa, se acidificó a pH 2.5 y se extrajo mediante SPE con la metodología descrita en el capítulo II, sección 2.1.1. Tras la elución de los cartuchos, y derivatización de los extractos en acetato de etilo, se inyectaron los extractos obtenidos (1 µL) para ambas fases en GC-MS. Las señales para cada analito en la fase acuosa y la fase orgánica se compararon con los obtenidos para una referencia (muestra de agua no sometida al proceso de LLE) concentrada por SPE. La tabla I.3 muestra los resultados obtenidos para triclosán, el más lipofílico de los tres analitos considerados y, por tanto, el que “a priori” va a presentar mayores dificultades para permanecer de forma cuantitativa en la fase acuosa a pH básico durante el proceso de LLE.

Tabla I.3. Porcentajes (%) de triclosán en las fases orgánica (FO) y acuosa (FA) considerando dos pH diferentes (11.5 y 13) y dos disolventes distintos (acetato de etilo y hexano). Valores normalizados respecto a una muestra de agua no sometida a LLE.

Disolvente	pH 11.5		pH 13	
	FO	FA	FO	FA
Acetato de etilo	92.5	0.5	--	--
Hexano	41.5	59.1	1.4	92.6

De acuerdo con los resultados mostrados en la tabla I.3, usando hexano como fase orgánica y agua ajustada a pH 13, el triclosán permanece prácticamente en el medio acuoso aún después de las etapas de LLE con este disolvente.

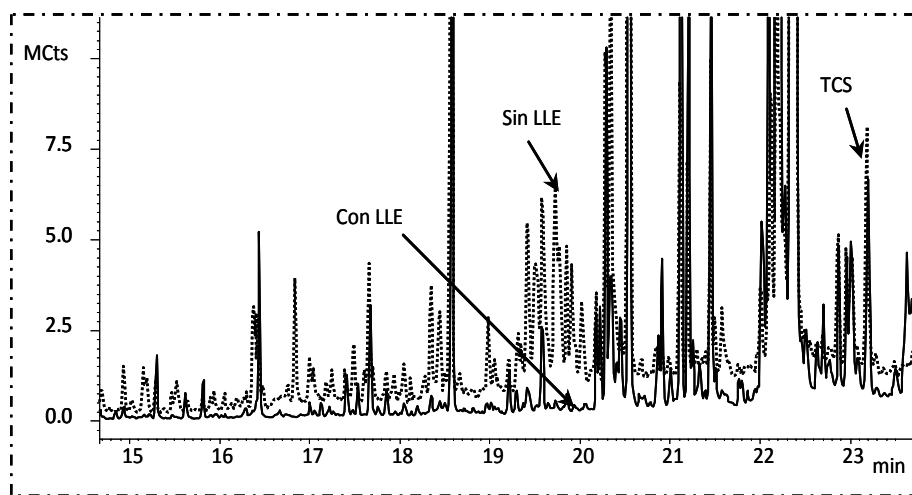
La distribución de los compuestos entre la FA y la FO de hexano a pH 13, fue re-evaluada en presencia de 30 mL de metanol o acetona, o mezcla de ambos disolventes al 50 %. Los resultados obtenidos, tabla I.4, muestran que no hubo diferencias en la distribución de los analitos entre la fase acuosa y la orgánica. Además, la referencia, realizada sin adición de disolventes y sin llevar a cabo la LLE, puso de manifiesto que la presencia de ese volumen de disolvente no afectó a la recuperación de la etapa de SPE.

Tabla I.4. Porcentajes (%) de los analitos en la FO y FA conteniendo metanol o acetona, con respecto a la referencia.

Disolvente presente en la FA	2,4-DCF		2,4,6-TCF		TCS	
	FO	FA	FO	FA	FO	FA
Acetona	0.04	96.1	0.02	96.0	0.48	94.0
Metanol	0	97.5	0	97.5	0.92	97.1
Act:MeOH (1:1)	0	92.5	0	99.9	0.49	112.4

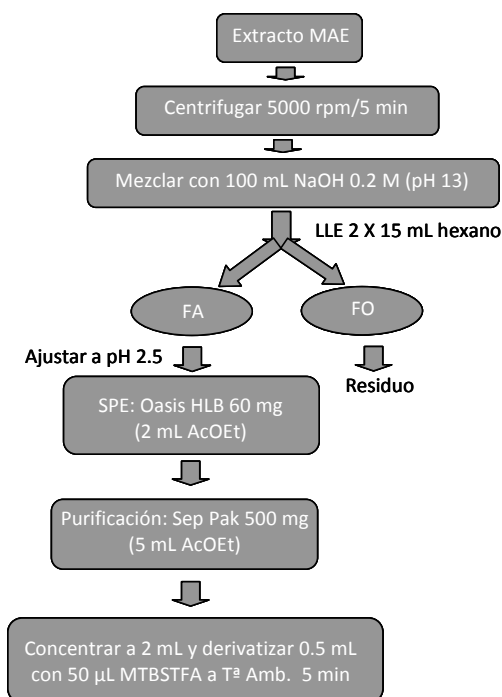
En base a estos resultados, se llevó a cabo la extracción de una muestra de lodo con 20 mL de metanol a 110°C durante 20 minutos. Tras centrifugar el extracto y diluirlo con 100 mL de NaOH 0.2 M a pH 13, se extrajo dos veces con 15 mL de n-hexano, añadiendo cloruro sódico (0.5 g) para facilitar la separación de ambas fases. La fase orgánica presentó una gran complejidad, probablemente debido a la presencia de grasas y otras especies de carácter apolar y básico. La fase acuosa, en cambio, presentó una apariencia menos compleja (prácticamente incolora) después de esta etapa de LLE. Esta fase acuosa fue ajustada a pH 2.5, concentrada mediante SPE y purificada con 500 mg de sílica neutra (protocolo descrito en el capítulo II, sección 2.1.1). En este último paso, la sílica retiene aquellas interferencias, de naturaleza más polar que los analitos, que no hayan podido ser eliminadas en las anteriores etapas de LLE ó SPE. El extracto final presentó una menor coloración, y por lo tanto complejidad, frente a aquel en el que se omitió la etapa de LLE y purificación con sílica neutra, figura I.5.

Figura I.5. Cromatogramas de GC-MS (TIC) de un lodo de depuradora con (línea continua) y sin etapa de limpieza mediante LLE (línea discontinua).



En la figura I.6 se resume el protocolo de purificación para los extractos de MAE procedentes de lodos de depuradora.

Figura 1.6. Esquema de purificación para extractos de lodos.



1.4. Optimización de las condiciones de extracción asistida por microondas

La optimización de los factores que afectan al proceso de extracción asistida por microondas se realizó mediante diseño de experimentos. La temperatura, el tipo y volumen de disolvente, la agitación y la adición de modificadores son factores que pueden influir significativamente en el rendimiento del proceso de extracción.

1.4.1. Temperatura, disolvente, volumen de disolvente y agitación

Los efectos del tipo de disolvente y su volumen, la temperatura y la agitación fueron estudiados mediante un diseño factorial fraccional de *screening* del tipo 2^{4-1} . Para la realización de los 8 experimentos implicados en este diseño, se preparó una muestra mezclando lodo primario y biológico (previamente liofilizados) en proporción 8:2 (p/p). Estudios previos mostraron que la cantidad nativa de triclosán en la muestra era considerable, en cambio, los clorofenoles presentaron

niveles mucho más bajos, por lo que la matriz fue fortificada con 2,4-DCF y 2,4,6-TCF. Para ello, se preparó una suspensión mezclando el sólido con un patrón de 2 µg/mL de ambos clorofenoles en acetona. Tras la evaporación del disolvente, la muestra se almacenó durante 5 días a temperatura ambiente, para favorecer la interacción entre los analitos y la matriz.

Para la realización de cada experimento del diseño, se pesaron 0.5 g de lodo y se extrajeron en las condiciones indicadas (tabla I.5), durante 20 minutos, aplicando una potencia de 500 W. Una vez obtenidos los extractos, se centrifugaron, y el sobrenadante se diluyó a 30 mL con el disolvente correspondiente, para posteriormente proceder a la etapa de limpieza, concentración y derivatización, figura I.6. Los extractos, una vez derivatizados fueron analizados mediante GC-MS/MS. Las condiciones de extracción, así como los resultados obtenidos (área de pico) para cada compuesto, se muestran en la tabla I.5.

Tabla I.5. Condiciones de extracción y respuestas (áreas de pico) obtenidas en el diseño factorial fraccional tipo 2^{4-1} .

Exp. Nº	Agitación	Tª (°C)	Disolvente	Vol. (mL)	2,4-DCF	2,4,6-TCF	TCS
1	Sí	130	Acetona	15	37421	66061	66334
2	No	130	Metanol	15	69878	101959	59088
3	No	130	Acetona	30	36347	58759	101671
4	Sí	130	Metanol	30	66412	87226	41164
5	Sí	90	Metanol	15	61843	87689	64864
6	No	90	Metanol	30	63386	85721	68419
7	No	90	Acetona	15	39997	75163	64774
8	Sí	90	Acetona	30	41794	55060	101807

Una vez introducidos estos resultados en el programa estadístico (Statgraphics 5.1), se calcularon los valores de los efectos principales asociados a cada factor estudiado (tabla I.6).

Tabla I.6. Efectos principales asociados a cada factor para el diseño factorial fraccional descrito en la tabla I.5.

Factor	Nivel bajo	Nivel alto	2,4-DCF	2,4,6-TCF	TCS
Disolvente	Acetona	Metanol	528	-164	-1164
Volumen (mL)	15	30	-16	-40	285
Temperatura (°C)	90	130	50	60	192
Agitación	No	Sí	43	-27	-36

A continuación, se optó por eliminar aquel factor que presentaba un efecto menor que el resto, obteniéndose así suficientes grados de libertad para calcular la significación estadística de los efectos restantes (tabla I.7).

Tabla I.7. Efectos principales normalizados asociados a cada factor tras eliminar aquellos factores menos significativos.

Factor	Nivel bajo	Nivel alto	2,4-DCF	2,4,6-TCF	TCS
Disolvente	Acetona	Metanol	32.4 ^a	-6.0	-32.3 ^a
Volumen (mL)	15	30	--	-1.5	7.9
Temperatura (°C)	90	130	3.1	2.2	5.3
Agitación	No	Sí	2.6	--	--

^aFactor estadísticamente significativo a un nivel de confianza de 95 %

El tipo de disolvente es el factor que ejerce una mayor influencia en la eficacia de extracción. Para el TCS y el 2,4,6-TCF, la acetona permitió obtener respuestas significativamente mejores (principalmente en el caso del TCS) que el metanol, mientras que para el más polar de los tres analitos, el 2,4-DCF, la utilización de metanol fue más favorable. Con respecto al volumen, el triclosán requiere volúmenes elevados de disolvente a diferencia de los clorofenoles, aunque su comportamiento no queda claro. La temperatura de extracción jugó un papel importante aunque no significativo en la recuperación de los compuestos, ejerciendo una influencia positiva en el rendimiento de la extracción. Por último, la agitación no presentó un papel importante para ninguno de ellos. En base a estos resultados, se fijó la temperatura en 130°C, mientras que se optó por prescindir de la agitación de la muestra dentro de los vasos del extractor de microondas.

1.4.2. Optimización del volumen de extractante, proporción metanol:acetona y modificador orgánico

Con el primer diseño de experimentos no se obtuvieron conclusiones claras sobre la influencia de ciertos factores en la eficacia de extracción. En un segundo diseño, se estudiaron con más detalle, el efecto del volumen de extractante y la composición del mismo (mezclas metanol:acetona), junto con un tercer factor, el ácido fórmico, utilizado como modificador del disolvente de extracción. La adición del ácido fórmico hace que el pH del medio sea ácido, favoreciendo la extracción de los compuestos con grupos ácidos, como los clorofenoles y el triclosán, sobre todo en aquellos lodos que han sido estabilizados con carbonato cálcico.

Los factores volumen de disolvente (15-30 mL), porcentaje de metanol en acetona (25-75 %) y volumen de ácido fórmico (0-300 µL) fueron estudiados mediante un diseño factorial a 2 niveles

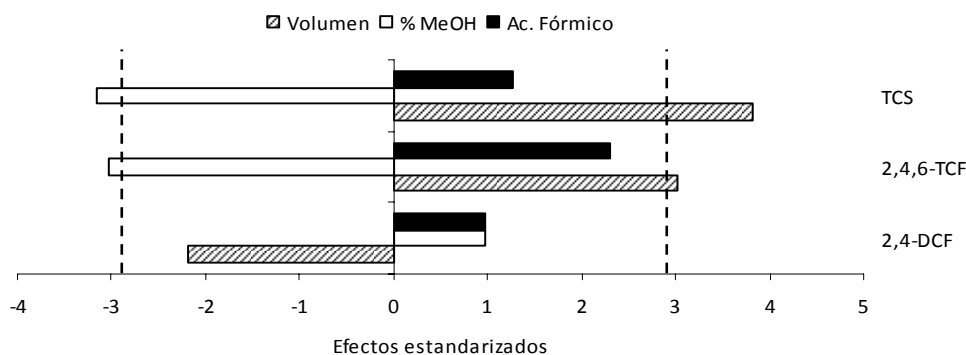
con un punto central. La muestra empleada para la realización del diseño fue la misma que en el caso anterior. Los resultados obtenidos (áreas de pico) se muestran a continuación, tabla I.8.

Tabla I.8. Condiciones experimentales y resultados obtenidos en el segundo diseño experimental.

Exp. N°	Volumen (mL)	% metanol en acetona	Ac.fórmico (μL)	2,4-DCF	2,4,6-TCF	TCS
1	22.5	50	150	46570	64963	40929
2	15	75	0	40444	47689	35256
3	30	75	0	37057	53742	50249
4	15	25	300	42770	57122	60909
5	15	25	0	43960	54972	42991
6	30	75	300	44293	62250	61198
7	30	25	0	37874	63901	73214
8	30	25	300	34702	71845	75032
9	15	75	300	46265	52802	33562

En la carta Pareto obtenida, figura I.7, se puede observar que el volumen de disolvente y el porcentaje de metanol son estadísticamente significativos para TCS y 2,4,6-TCF. Para ambos compuestos, un incremento en el volumen de extractante y una disminución de su polaridad (reducción del porcentaje de metanol) conllevan una mejora en la eficacia de extracción. En el caso del 2,4-DCF ningún factor fue estadísticamente significativo.

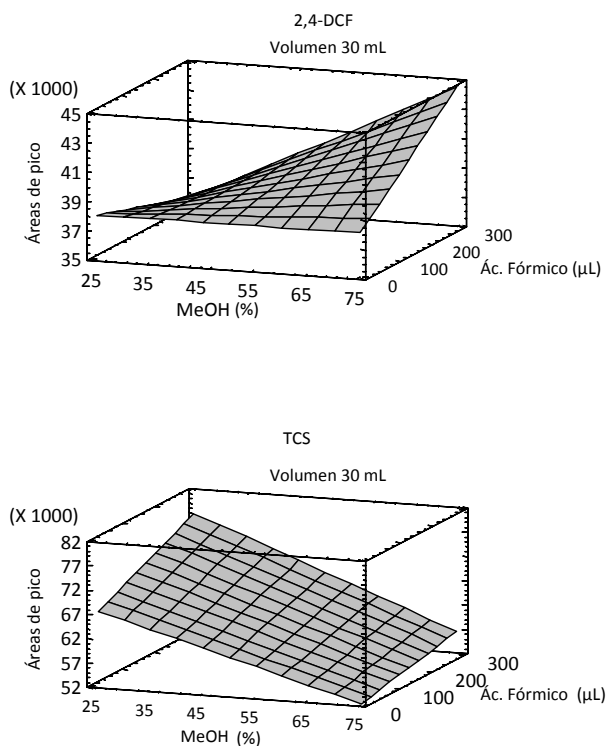
Figura I.7. Carta Pareto obtenida para el 2,4-DCF, 2,4,6-TCF y TCS.



El ácido fórmico, aunque no alcanzó el nivel de significación estadística (95 % confianza) para ninguno de los analitos, afectó positivamente a la extracción. El mayor efecto se observó para el compuesto que presenta un menor pK_a , el 2,4,6-triclorofenol, justificando la adición del modificador para la obtención de mejores recuperaciones de los compuestos presentes en la matriz sólida.

Las superficies de respuesta estimadas ácido fórmico frente a porcentaje de metanol para el triclosán y el 2,4-DCF, con un volumen de 30 mL de disolvente, se presentan en la figura I.8. En ellas se observa claramente un comportamiento opuesto en función de la polaridad de la mezcla. El 2,4-DCF es más polar que el 2,4,6-TCF y el TCS, extrayéndose más fácilmente con porcentajes elevados de metanol, mientras que TCS prefiere mezclas de extracción con un mayor contenido en acetona. Se optó por una solución de compromiso seleccionando una mezcla 1:1 de metanol:acetona para realizar la extracción.

Figura I.8. Superficies de respuesta estimadas para el 2,4-DCF y TCS, considerando un volumen de 30 mL de disolvente.



En base a los resultados obtenidos con ambos diseños, las condiciones de extracción seleccionadas han sido las que se muestran en la tabla I.9.

Tabla I.9. Condiciones de extracción (MAE) para TCS, 2,4-DCF y 2,4,6-TCF en muestras de lodo de depuradora y sedimento.

Potencia (W)	500		Disolvente	Metanol:acetona (1:1) con 300 μ L ácido fórmico
Masa muestra (g)	0.5-1			
Temperatura ($^{\circ}$ C)	130			
Tiempo (min)	20			

1.5. Caracterización del método analítico

1.5.1. Caracterización del método de determinación (GC-MS/MS): linealidad, repetibilidad y LOQs

La caracterización del método de GC-MS/MS, como técnica de detección, fue llevada a cabo utilizando patrones mezcla de los tres compuestos preparados en acetato de etilo a distintas concentraciones. Los patrones se derivatizaron en las mismas condiciones descritas para los extractos de muestras acuosas obtenidas mediante SPE (500 μ L de extracto y 20 μ L de MTBSTFA a temperatura ambiente durante 5 minutos).

El rango lineal se evaluó desde 1 hasta 1500 ng/mL, inyectando los analitos a 6 niveles de distinta concentración en triplicado, y la repetibilidad de inyección fue estudiada realizando cinco inyecciones consecutivas de dos patrones de 5 y 250 ng/mL (tabla I.10).

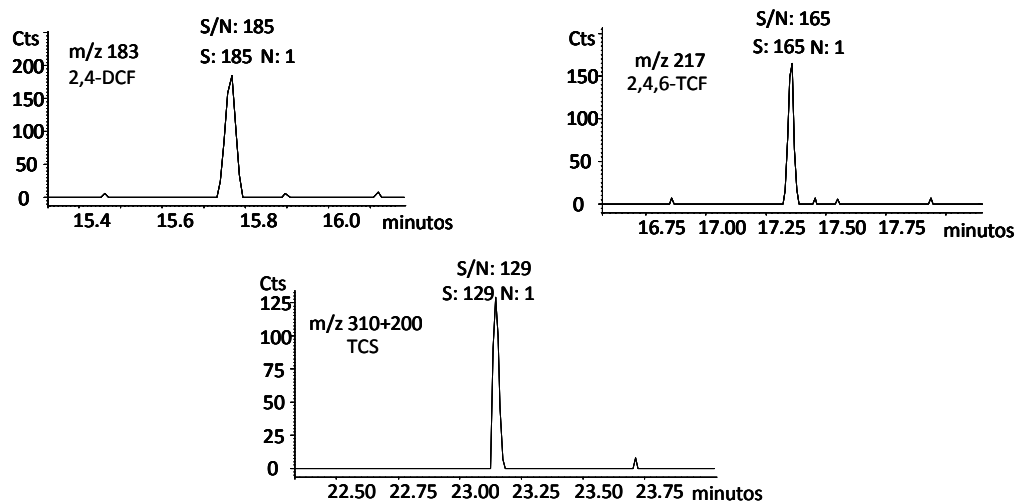
Tabla I.10. Linealidad, precisión y LOQs del método de determinación, GC-MS/MS.

		2,4-DCF	2,4,6-TCF	TCS
Linealidad (R^2)		0.998	0.996	0.999
Repetibilidad	5 ng/mL	4.2	4.4	8.3
(% RSD, n=5)	250 ng/mL	4.1	3.6	5.3
LOQ (ng/mL)		0.2	0.2	0.2

Los coeficientes de determinación obtenidos oscilaron entre 0.996 y 0.999. En todos los casos, los coeficientes de variación fueron inferiores al 8 %. Por último, los límites de cuantificación

instrumentales, han sido de 0.2 ng/mL (figura I.9), 10 veces inferiores a los obtenidos con detección por GC-MS (tabla III.6, capítulo III).

Figura I.9. Patrón de 1 ng/mL con las correspondientes relaciones S/N para 2,4-DCF, 2,4,6-TCF y TCS.



1.5.2. Exactitud, precisión y límites de cuantificación del método analítico

La exactitud, precisión y límites de cuantificación del método analítico propuesto fueron evaluados con cuatro matrices: lodo primario, lodo secundario, lodo tratado con carbonato cálcico (lodo estabilizado) y sedimento de río. Todas estas muestras fueron liofilizadas previamente y caracterizadas en cuanto a su contenido de carbono. En general, los lodos presentaron niveles de carbono orgánico (TOC) del orden de 36-38 %, mientras que en sedimentos de río se encontraron próximos al 1 %.

Para evaluar la exactitud del método de preparación de muestra, se preparó una suspensión de cada muestra con un patrón de concentración conocida de los analitos en acetona, realizando una mezcla 1:1 (1 mL de patrón por cada gramo de muestra) entre ambos. La mezcla se dejó evaporar, teniendo especial cuidado de no calentar ni exponer a la luz. Una vez seca, se cerró y se dejó envejecer a temperatura ambiente durante varios días. Las concentraciones adicionadas dependieron de la matriz estudiada. Para las muestras de lodo la adición de los clorofenoles fue de 300 ng/g, mientras que para el triclosán fue de 5 µg/g, dado que estos compuestos se encontraron en el lodo a niveles elevados. Para el caso de los sedimentos, la concentración adicionada fue de 300

ng/g. Con objeto de evaluar la exactitud del método a concentraciones inferiores, se prepararon otras muestras con niveles de adición del orden de 40 ng/g para los clorofenoles y 900 ng/g para el triclosán en lodo estabilizado químicamente, y de 10 ng/g en una muestra de sedimento de río conteniendo sólo trazas de triclosán.

Para cada una de las matrices consideradas se procesaron fracciones con y sin adición de los analitos. Las recuperaciones se calcularon como los cocientes entre la diferencia de concentraciones para fracciones con adición y sin adición, y la concentración añadida a cada muestra, tabla I.11. En el caso del sedimento, el tamaño de muestra considerado fue de 1 g en lugar de 0.5 g para mejorar los LOQs en esta matriz. Es preciso destacar también que los extractos de lodo estabilizado, obtenidos sin añadir ácido fórmico a la mezcla de extracción, no presentaron señales para ninguno de los tres analitos considerados.

Tabla I.11. Recuperaciones obtenidas (%) para muestras de lodo y sedimento con adición (N=4).

Muestra	% TOC	Nivel añadido (ng/g)	Recuperaciones ± RSD (%)		
			2,4-DCF	2,4,6-TCF	TCS
<i>Sedimento río</i>	0.8	10	81.8±5.7	96.0±4.9	98.7±8.5
<i>Sedimento río</i>	0.8	300	79.1±8.2	92.0±8.9	99.7±6.5
<i>Lodo primario</i>	38	300 ^a	79.1±8.2	98.9±3.2	81.7±6.5
<i>Lodo secundario</i>	36	300 ^a	78.3±8.1	87.6±5.1	94.0±6.5
<i>Lodo estabilizado</i>	11	300 ^a	106.6±7.5	88.3±5.0	82.2±11.5
<i>Lodo estabilizado</i>	11	40 ^b	82.9±9.2	97.4±13.0	97.3±10.5

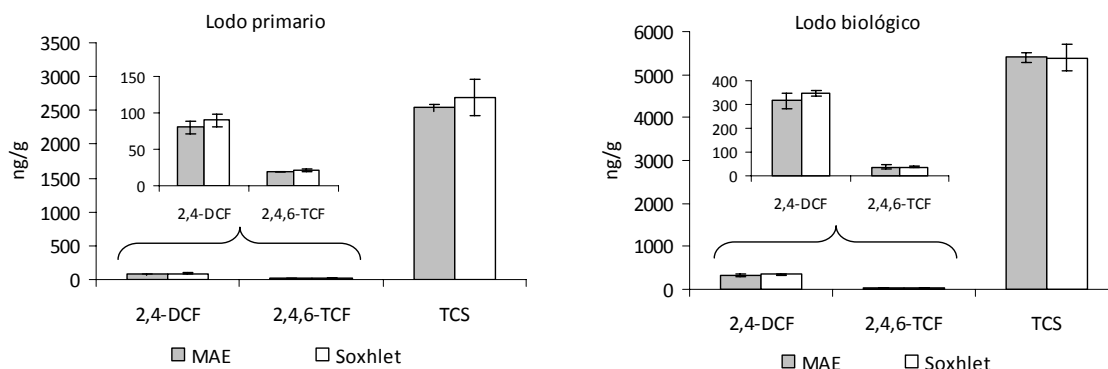
^a 5 µg/g para TCS

^b 0.9 µg/g para TCS

Tal como se puede comprobar, en general las recuperaciones obtenidas fueron superiores al 80 %, con desviaciones estándar por debajo del 13 %.

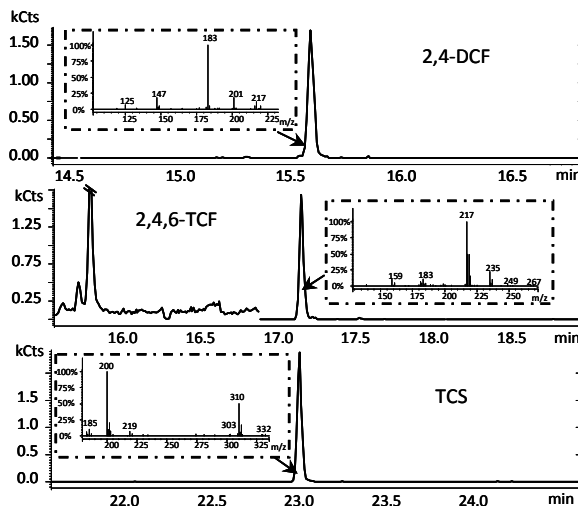
Además de utilizar muestras con adición para evaluar la exactitud del método desarrollado, se compararon los resultados obtenidos para muestras sin adición procesadas usando Soxhlet, para una muestra de lodo primario y otra de lodo biológico. La extracción Soxhlet se llevó a cabo durante 24 horas con 100 mL de una mezcla de metanol:acetona (1:1). El extracto obtenido fue concentrado a 30 mL, y se procedió a la limpieza mediante LLE con hexano, posterior concentración de la fase acuosa, y purificación del extracto final. Los resultados obtenidos fueron similares con ambas metodologías, figura I.10.

Figura I.10. Comparación de Soxhlet con MAE para la determinación de TCS, 2,4-DCF y 2,4,6-TCF en lodo primario y biológico.



Los límites de cuantificación del método propuesto con detección mediante GC-MS/MS, se calcularon teniendo en cuenta los LOQs instrumentales, la masa de muestra (1 g para sedimento, 0.5 g para lodo) y el volumen del extracto final (2 mL). Los blancos de proceso no mostraron problemas de contaminación. En base a esta información se estimaron unos LOQs de 0.8 ng/g y 0.4 ng/g para lodo y sedimento, respectivamente. En la figura I.11 se muestra un cromatograma de una muestra a niveles próximos a los límites de cuantificación.

Figura I.11. Cromatogramas y espectros de MS/MS para una muestra de sedimento con adición de los compuestos estudiados a nivel de 10 ng/g.



La utilización de GC-MS/MS no solamente permite aumentar la selectividad, sino que también permite obtener LOQs diez veces más bajos que GC-MS, dado a que aísla el ión precursor en la trampa para proceder a su posterior fragmentación. Esto permitió, en el caso del triclosán, discriminar la señal del analito (345+347) de la interferencia de m/z 327 (figura I.2). En general, los límites son mejores que los encontrados en la bibliografía. Por otra parte, una de las limitaciones de esta metodología con respecto a otras descritas en la bibliografía, ha sido la imposibilidad de recuperar el metiltriclosán, puesto que este se pierde en la etapa de LLE con n-hexano [Singer H; 2002][Mc Avoy DC; 2002].

1.6. Aplicación al análisis de muestras reales

La metodología desarrollada se aplicó al análisis de varias muestras de lodo, de sedimentos de río y marino. En todos los casos, las muestras fueron liofilizadas y homogeneizadas, almacenándolas posteriormente a temperatura ambiente previamente a su análisis. Se procesaron 0.5 g de muestra para lodo y 1 g para sedimento, realizando en todos los casos la extracción por triplicado. Las concentraciones obtenidas se muestran en la tabla I.12.

Tabla I.12. Concentraciones de los analitos (ng/g) en sedimentos de río, marino y lodos de depuradora.

Código	Tipo muestra	Concentración \pm SD (ng/g)		
		2,4-DCF	2,4,6-TCF	TCS
1	Sedimento río	nd	nd	4.4 \pm 0.8
2	Sedimento río	nd	nd	nd
3	Sedimento río	nd	nd	35.7 \pm 1.1
4	Sedimento marino	nd	nd	nd
5	Lodo primario	79.9 \pm 8.5	19.4 \pm 0.3	2543 \pm 50
6	Lodo biológico	316 \pm 33	38.1 \pm 9.2	5400 \pm 125
7	Lodo estabilizado	77.9 \pm 8.5	15.8 \pm 2.4	1508 \pm 196
8	Lodo	74.4 \pm 1.0	7.5 \pm 1.0	1474 \pm 240
9	Lodo	55.2 \pm 3.3	14.5 \pm 0.5	418 \pm 38

nd: por debajo de los LOQ

Dentro de las muestras analizadas se detectó triclosán en la mayoría de las mismas, a concentraciones superiores a 1 μ g/g para cuatro de los cinco lodos estudiados. En el caso de los clorofenoles, las concentraciones estuvieron por debajo de los LOQs del método en los sedimentos, mientras que en los lodos las concentraciones fueron entre 10 y 100 veces inferiores a las medidas para triclosán. Los resultados son comparables a los descritos en la bibliografía, y la distribución

existente en el lodo puede explicarse en base a las propiedades de los compuestos, puesto que a pH 7, los clorofenoles presentan una solubilidad entre 3.2 y 3.9 g/L, mientras que el triclosán tiene una solubilidad de 0.005 g/L. Además, éste último presenta niveles en agua superiores a los dos clorofenoles (tabla IV.1, capítulo III).

En el caso de los lodos de depuradora, las muestras codificadas como 5, 6 y 7 se corresponden a muestras puntuales tomadas en la misma planta de tratamiento de agua residual. Las mayores concentraciones de los compuestos estudiados correspondieron a la muestra de lodo biológico, seguido del primario. El lodo estabilizado, el cual procede de una mezcla de lodo primario y biológico tratado con carbonato cálcico, es utilizado en la agricultura como fertilizante. Los niveles de los compuestos estudiados, aunque inferiores que los detectados en los lodos de partida, son lo suficientemente considerables (sobre todo en el caso del triclosán) como para representar una contribución importante a su introducción en el medio ambiente, de modo que es necesario el control de estos residuos sólidos utilizados para usos agrícolas. Por otro lado, la incineración de estos lodos debe considerarse también con suma precaución ya que el triclosán podría derivar en la formación de dibenzodioxinas [Kanetoshi A; 1987].

En vista a los datos presentados en la tabla anterior, resulta evidente que los balances de eliminación de triclosán, realizados única y exclusivamente en base a determinaciones en las corrientes de entrada y salida (influyente y efluente, respectivamente) de las estaciones depuradoras, resultan erróneos, ya que una fracción importante de este compuesto es adsorbida en los lodos.



CAPÍTULO V

I. DETERMINACIÓN CONJUNTA DE TRICLOSÁN Y PARABENOS EN MUESTRAS DE POLVO

1.1. Introducción

El estudio de la presencia de compuestos orgánicos en atmósferas interiores ha experimentado un auge importante durante los últimos años. Este medio constituye una fuente de exposición del ser humano (vías respiratorias y dérmicas) a un número creciente de compuestos químicos usados en materiales de construcción, muebles, electrodomésticos y equipos electrónicos, así como en aerosoles y productos de cuidado personal. En el caso del triclosán y los parabenos, la información relativa a su presencia en atmósferas interiores es prácticamente inexistente. Sólo se ha encontrado una referencia en la que, junto con otros compuestos orgánicos, se estudiaron los niveles de MeP, EtP y BuP en muestras de aire y polvo tomadas en atmósferas interiores [Rudel RA; 2003]. En este trabajo, el aire se pasó a través de un polímero XAD-2, que posteriormente fue extraído con diclorometano (150 mL). Las muestras de polvo se obtuvieron de bolsas de aspiradora, analizando la fracción con un tamaño de partícula inferior a 150 μm . Para la extracción de diversos compuestos fenólicos, entre ellos los parabenos, se realizó un ataque ácido de las muestras de polvo con una mezcla 1:1 de ácido sulfúrico:agua, tras lo cual se procedió a la extracción sólido-líquido en triplicado con diclorometano. Tanto los extractos de aire como los de polvo, se concentraron a 1 mL y se derivatizaron con BSTFA a 60°C, durante 60 minutos para ser analizados mediante GC-MS. Los niveles de parabenos encontrados fueron inferiores a 21 ng/m^3 para aire y 8 $\mu\text{g}/\text{g}$ para polvo. En el caso del triclosán, no se ha encontrado ninguna referencia relacionada con su determinación en atmósferas interiores.

Dentro de las actividades realizadas en esta Tesis Doctoral se ha considerado relevante evaluar los niveles de TCS y parabenos (MeP, EtP, PrP y BuP) en atmósferas interiores usando muestras de polvo, procedentes de aspiradores domésticos, como matriz para realizar el estudio. El trabajo realizado se ha centrado en el desarrollo de dos metodologías de preparación de muestra diferentes (combinando las etapas de extracción y purificación) para a continuación proceder a la sililación de los analitos y su posterior determinación mediante GC-MS/MS, en las condiciones optimizadas en los capítulos previos para muestras de aguas y lodos.

Las técnicas de preparación de muestra consideradas han sido la extracción presurizada con disolventes (PLE) y la dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD). La primera presenta un elevado grado de automatización permitiendo procesar, sin necesidad de un usuario dedicado, un número considerable de muestras. Dentro de las aplicaciones de PLE para la extracción de nuestros analitos, sólo se han encontrado referencias centradas en la determinación de triclosán en muestras de lodo de depuradora y sedimento (tabla I.1). Por su parte, MSPD es una técnica que no requiere la adquisición de instrumentación específica y, además, precisa volúmenes de disolventes

relativamente bajos. Aunque su eficacia como técnica de preparación para alimentos y muestras biológicas ha sido evaluada de forma extensa [Barker SA; 2007] sus aplicaciones a otras matrices sólidas, por ejemplo suelos y muestras de polvo, son mucho más limitadas [García-López M; 2008].

Tabla I.1. Resumen de las aplicaciones de PLE para la extracción de TCS.

Analitos y matriz	Procedimiento	Detección	LOD (ng/g)	RSD (%)	Rec. (%)	Ref.
TCS y MTCS en pescado	PLE: 5 g de pescado + hidromatrix en celda de 22 mL. Ciclohexano:DCM (1:1) a T ^o Amb, 1500 psi, 3 ciclos de 9 min. Adicionar ¹³ C ₁₂ PCB-30, y hacer GPC. Purificar con 800 mg de sílica activada con 5 % de agua, eluyendo con 10 mL de Hexano:AcOEt (10:1). Concentrar a 50-200 µL.	GC-MS	1	--	76-108	(1)
TCS y bifenilol en sedimentos marinos	PLE: 10 g de liofilizado+2 g hidromatrix, en celda de 22 mL. DCM, 100°C, 1500 psi, 1 ciclo de 5 min. Evaporar a 5 mL y purificación con 1 g de sílica, eluyendo con acetona y metanol. Llevar a sequedad y reconstituir con fase móvil.	GC-MS LC-MS/MS	3.5	7	100	(2)
TCS y MTCS en sedimentos y lodos de depuradora	PLE: 1 g liofilizado. DCM, 100°C, 1500 psi, 3 ciclos de 5 min. Purificación con 2 g de sílica y elución con 2 mL de DCM, evaporando a sequedad. Derivatizar con diazometano. Eliminación de disolvente, reconstituir con AcOEt.	GC-MS/MS	1.5	3	95	(3)
TCS y TCC en lodos	PLE: 0.1-0.2 g de liofilizado, dispersar con 3 g de hidromatrix, DCM a 60°C y 1500 psi, 3 ciclos de 5 min. Purificar con Oasis HLB 500 mg, lavando con hexano, DCM y agua, eluir con MeOH:Acetona (1:1). Concentrar a sequedad y reconstituir con MeOH.	LC-MS/MS	1.5	6	98	(4)
TCS y PPCPs en lodos de depuradora	PLE: 0.5 g liofilizado + material inerte en celdas de 33 mL. Extracción con AcOEt a 130°C, 2 ciclos de 45 min. Evaporar a 1 mL, y diluir 1:9 con tolueno.	GC-MS	31	--	70-130	(5)
TCS y fármacos en lodos y suelos enriquecidos con lodos	PLE: 2.7 g suelo ó 1 g lodo liofilizado + arena en celdas de 33 mL. Extracción con MeOH:agua (1:1) a 60°C/1500 psi con 2 ciclos estáticos de 5 min. Concentrar y hacer SPE Oasis HLB 200 mg.	LC-MS/MS	20	3.0-4.6	100	(6)

(1) Balmer ME, 2004; (2) Agüera A, 2003; (3) Singer H, 2002; (4) Chu S, 2007; (5) Ligon AP, 2008; (6) Barron L, 2008.

PLE presenta la ventaja de poder controlar la selectividad de la extracción rellenando la celda con distintos adsorbentes en vez de materiales inertes [Canosa P; 2007 A]. La disposición del adsorbente puede tener múltiples propósitos. Colocado en la parte inferior de la celda, inmediatamente después de la muestra, tiene la finalidad de retener las interferencias co-extraídas o destruirlas [Björklund E; 2006]. A modo de ejemplo, la utilización de adsorbentes de fase normal químicamente modificados, como la sílice ácida en combinación con disolventes apolares como hexano, permite obtener extractos libres de grasas en el análisis de alimentos.

Homogeneizar la muestra, previamente a su empaquetamiento en la celda del equipo, con un adsorbente en fase normal o reversa también permite mejorar la selectividad de la extracción [de la Cal A; 2003][Gómez-Ariza JL; 2002].

Con respecto a la técnica de dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) sus principales virtudes son la sencillez, rapidez, selectividad y bajo coste. La adecuada combinación de adsorbentes y disolventes permite obtener extractos libres de impurezas. Su aplicación en matrices medioambientales no es la más habitual, aunque los resultados hasta ahora obtenidos son tan buenos como los proporcionados por PLE o MAE [García-López M; 2008].

1.2. Condiciones experimentales de medida

Como se ha comentado en el apartado anterior, GC-MS/MS ha sido la técnica de determinación utilizada para cuantificar los niveles de triclosán y parabenos en muestras de polvo tras su sililación. Las condiciones de trabajo empleadas se recopilan en la siguiente tabla (tabla I.2).

Tabla I.2. Parámetros de determinación para triclosán, metilparaben, etilparaben, propilparaben y butilparaben.

	Tr (min) ¹	Tr (min) ²	Ión precursor (m/z)	Nivel de almacenamiento (m/z)	Amplitud de excitación (V)	Iones producto (m/z) ³
MeP	17.05	17.38	209	92	0.5	195,177,149
EtP	17.83	18.15	223	98	0.5	195,177,163,151
PrP	18.91	19.20	237	104	0.5	195,163,151
BuP	19.91	20.24	251	110	0.5	195,151
TCS	23.13	23.38	347	140	1.5	200,310,219

¹ Columna HP5-MS ² Columna CP-Sil8 Low Bleed ³ Iones utilizados para la cuantificación

Además, en algunas ocasiones se ha utilizado GC-MS como técnica de detección, principalmente para registrar el perfil de corriente iónica total que producen los extractos obtenidos, evaluando así su complejidad bajo diferentes condiciones de extracción.

1.3. Extracción con disolventes presurizados

La matriz empleada para evaluar la presencia de triclosán y parabenes en atmósferas interiores correspondió al contenido de las bolsas de aspiradores domésticos. Con objeto de incrementar la homogeneidad de la matriz, el contenido de las bolsas fue tamizado y la fracción por debajo de las 60 µm empleada en este estudio.

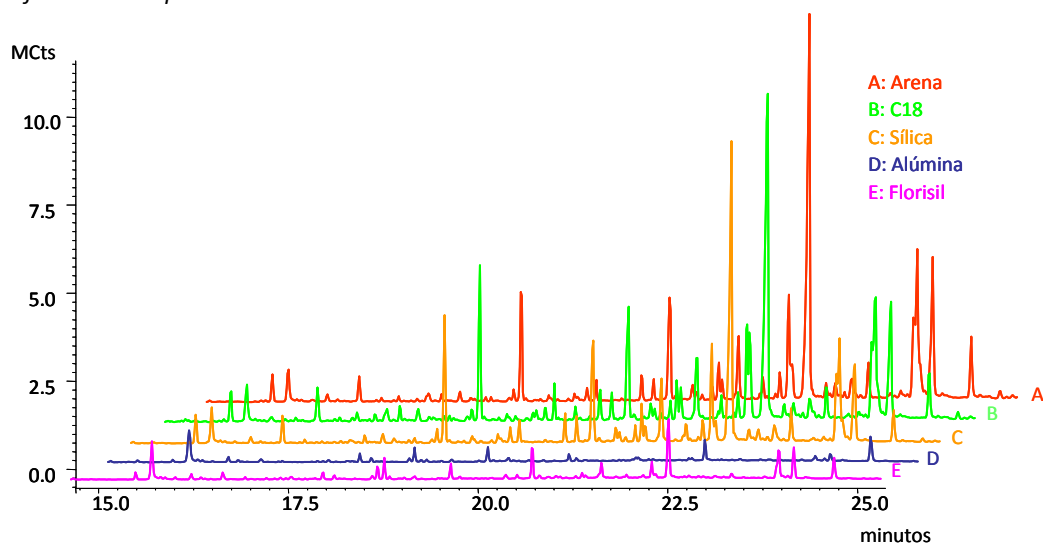
Para optimizar los factores que afectan a la eficacia de los procesos de extracción y *clean-up* se ha utilizado un *pool* de dos matrices (1:1) con contenidos de carbono orgánico de 24.7 y 25.6 %. Una vez verificada la existencia de niveles considerables de TCS, MeP y PrP en la muestra compuesta, se procedió a su fortificación con EtP y BuP, a nivel de 300 ng/g. Para ello se añadió 1 mL de una disolución patrón de EtP y BuP de 300 ng/mL en acetona por cada gramo de polvo. Tras la evaporación del disolvente, la muestra se dejó envejecer durante varios días a temperatura ambiente.

1.3.1. Estrategia de purificación

La eficacia de la purificación *on-line* (en la celda de extracción) de los extractos de PLE se evaluó considerando cuatro adsorbentes diferentes, tres en fase normal (Florisil 60-100 mesh, alúmina 150 mesh y sílica 230-400 mesh), previamente activados a 130°C durante 24 horas, y uno de fase reversa (C18 70-230 mesh). En todos los casos, 0.5 g de muestra se homogeneizaron con 1 g de sulfato sódico anhidro y 2.5 g del adsorbente considerado en un mortero de vidrio. Una vez se obtuvo una mezcla homogénea, se introdujo en la celda del extractor de PLE, conteniendo, de abajo a arriba, dos filtros de celulosa, 1 g de sulfato sódico anhidro y 1.5 g del mismo adsorbente utilizado en la dispersión. La celda se rellenó con sulfato sódico y se compactó, colocando un filtro de celulosa en la parte superior. Cabe destacar que, para el caso de la alúmina, debido a su mayor densidad, la masa utilizada fue el doble que para los otros adsorbentes.

Las condiciones de trabajo en estas etapas iniciales fueron seleccionadas teniendo en cuenta aplicaciones de PLE al análisis de sedimentos. La extracción se llevó a cabo con acetato de etilo, a 130°C considerando un ciclo de 10 minutos a 2000 psi (13.8 MPa). El volumen de lavado ("*flush*") y el tiempo de purga con nitrógeno de la celda fueron de 100 % y de 60 segundos, respectivamente. Una vez obtenidos los extractos, se concentraron a 5 mL, y una alícuota de 500 µL se derivatizó con 40 µL de MTBSTFA a 70°C durante 60 minutos. El perfil de corriente iónica total (TIC) obtenido con cada adsorbente se muestra en la siguiente figura (figura I.1).

Figura I.1. Cromatogramas de GC-MS (TIC) obtenidos para fracciones de una misma muestra de polvo en función del tipo de adsorbente.



Como se observa en la figura anterior, la sílica y el C18 proporcionaron cromatogramas muy complejos, similares a los obtenidos con arena. Para Florisil y alúmina se observó un menor número de interferencias co-extraídas, indicando que estas fueron retenidas en mayor extensión por estos adsorbentes. Al inyectar estos extractos en GC-MS/MS, se obtuvieron respuestas ligeramente superiores cuando se usa Florisil como dispersante de la muestra y co-adsorbente en el fondo de la celda, tabla I.3. En base a estos resultados, se seleccionó el Florisil como agente dispersante para experimentos posteriores.

Tabla I.3. Áreas de pico en los extractos de PLE.

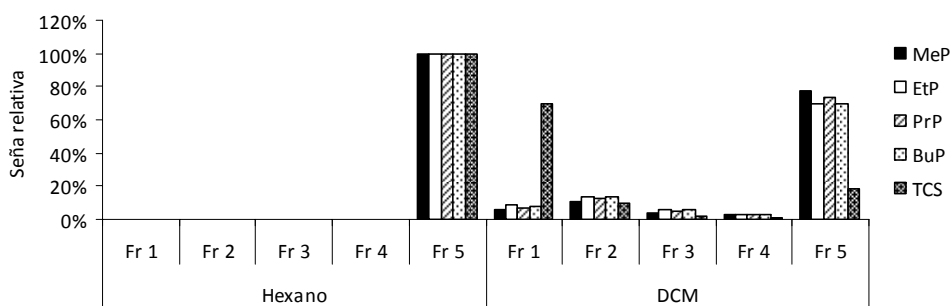
	MeP	EtP	PrP	BuP	TCS
Florisil	5126	2238	2357	4764	6441
Alúmina	2953	1711	1743	4590	4938

Para incrementar la selectividad del método, se planteó la posibilidad de realizar una etapa de lavado, previa al proceso de extracción, con objeto de eliminar compuestos apolares no retenidos por el Florisil y que contribuyen a incrementar la complejidad del extracto. Esta estrategia fue descrita por Papagiannopoulos [Papagiannopoulos M; 2002] en la determinación de polifenoles en plantas y alimentos, realizando un lavado de la celda de extracción con pentano a 60°C, seguida de la extracción de los analitos con acetona en condiciones más enérgicas.

Para este estudio, se seleccionaron dos disolventes de características apolares: hexano y

diclorometano. La etapa de lavado se realizó en condiciones suaves de temperatura, presión y tiempo (40°C, 1 ciclo de 1 minuto de extracción estática a 500 psi), con un volumen de *flush* de 50 % y un tiempo de purga de 1 minuto. Cada muestra fue extraída con cuatro ciclos consecutivos de lavado en las condiciones fijadas, recogiendo las fracciones en distintos viales colectores. A continuación, se extrajo con acetato de etilo para poner de manifiesto la presencia de los parabenes en la matriz. Todos los extractos (fracciones de lavado y extracto en acetato de etilo) fueron evaporados a sequedad bajo corriente de nitrógeno y reconstituidos con 2 mL de acetato de etilo, procediendo a su derivatización e inyección en GC-MS/MS, figura I.2.

Figura I.2. Distribución de los analitos entre las fracciones de lavado (Fr 1-Fr 4) y el extracto en acetato de etilo (Fr 5).

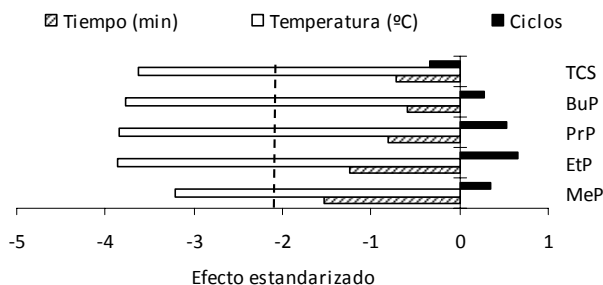


La utilización de n-hexano no provocó pérdidas de los analitos en las fracciones de lavado, recuperándose en la última fracción de acetato de etilo. Por su parte, el uso de diclorometano ocasionó la aparición de señal de los compuestos en las fracciones sucesivas de lavado, principalmente del TCS. Este comportamiento es coherente con la bibliografía existente para la extracción de triclosán en matrices sólidas mediante PLE, ya que algunos autores utilizan diclorometano como disolvente de elución [Agüera A; 2003]. En base a estos resultados, el hexano se seleccionó como disolvente de limpieza de la celda de PLE, previamente a la extracción de los compuestos de interés.

Para la optimización de las condiciones de limpieza con hexano, en lo referente a temperatura (40-120 °C), tiempo (1-10 minutos) y número de ciclos (1-5), se utilizó un diseño factorial a dos niveles con un punto central. Tras la etapa de lavado, de acuerdo con las condiciones descritas en cada uno de los experimentos del diseño, las celdas fueron extraídas con acetato de etilo en las condiciones propuestas (1 ciclo de 10 minutos a 130°C y 2000 psi, *flush* de 100 % y purga de 1 minuto). Estos extractos (acetato de etilo), una vez concentrados y derivatizados, fueron inyectados en el sistema GC-MS/MS. El objetivo de este estudio fue seleccionar las condiciones de lavado más enérgicas que no impliquen pérdidas de los analitos. La carta Pareto con los efectos

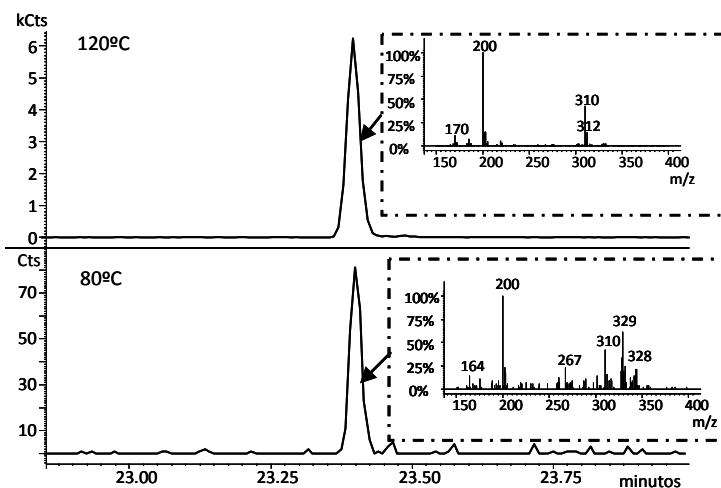
principales estandarizados se muestra en la figura I.3.

Figura I.3. Carta Pareto para el diseño de lavado con hexano.



Como se puede comprobar, la temperatura ha sido la variable más relevante. El valor de su efecto estandarizado es superior a la línea que describe el nivel de significación, con un 95 % de confianza, para todos los analitos. Puesto que su influencia es negativa, a altas temperaturas parte de los compuestos son co-eluidos con las interferencias apolares en el hexano. Experimentos adicionales realizados a 80°C y 120°C, en los valores intermedios para el número de ciclos y el tiempo de extracción, pusieron de manifiesto la presencia de triclosán, aunque no de los parabenos, en la fracción de lavado, incluso manteniendo la celda a 80°C, figura I.4.

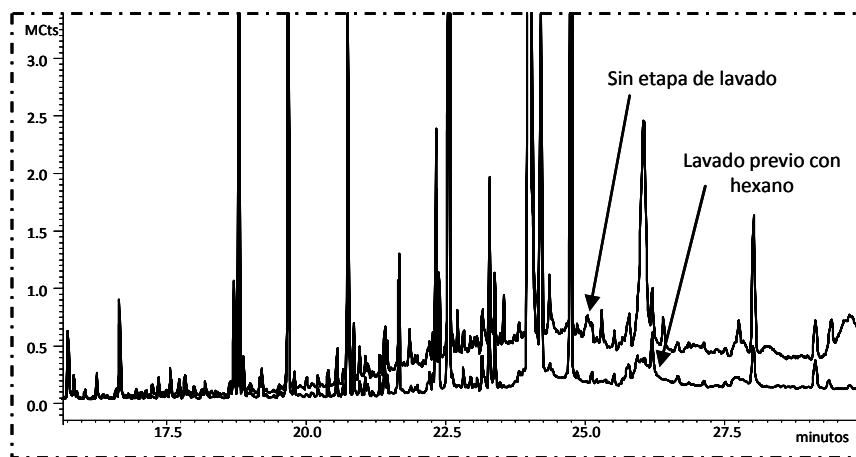
Figura I.4. Fracciones de hexano eluidas a 80°C y 120°C en 3 ciclos de 6 minutos. Señal correspondiente al TCS.



En base a estos resultados, la temperatura de la celda en la etapa de lavado se mantuvo a 40°C para evitar posibles pérdidas de TCS. El tiempo y el número de ciclos, correspondientes a la etapa de lavado, se fijaron en 4 minutos y 1 ciclo, respectivamente, ya que el uso de tiempos más largos o un número mayor de ciclos, aunque no provocó pérdidas de los analitos, tampoco contribuyó a reducir el nivel de interferencias.

La comparación de los cromatogramas de GC-MS (TIC) obtenidos para los extractos de muestras de polvo con y sin limpieza previa de la celda con hexano, mostraron una mejora considerable en el perfil del cromatograma obtenido, tal como se puede apreciar en la figura 1.5.

Figura 1.5. Cromatogramas de GC-MS para una muestra de polvo (extracto en acetato de etilo) con y sin etapa de lavado.



1.3.2. Optimización de las condiciones de extracción

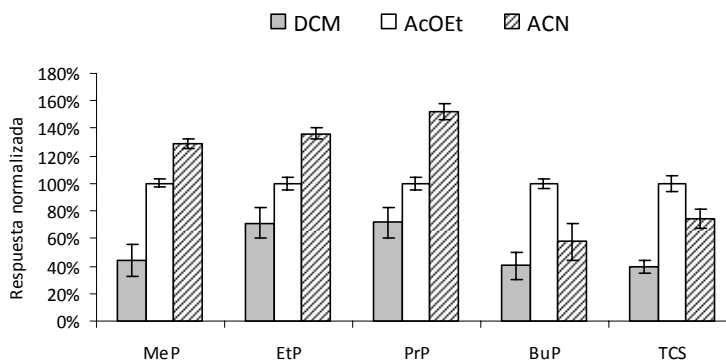
Una vez verificada la posibilidad de integrar una etapa de limpieza *on-line*, consistente en la utilización de un adsorbente en fase normal (Florisil) en la celda de extracción y la introducción de una etapa de lavado previa a la elución de los analitos, se procedió a la optimización de las condiciones de extracción.

1.3.2.1. Disolvente de extracción

El primer factor estudiado fue el tipo de disolvente empleado para la extracción de los compuestos. En función de sus características físico-químicas, se seleccionaron tres disolventes con polaridad creciente que además fuesen compatibles con la etapa posterior de sililación:

diclorometano, acetato de etilo y acetonitrilo. Para la realización de los experimentos, las celdas se rellenaron siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Tras una primera etapa de lavado con hexano a 40°C, se extrajeron con diclorometano, acetato de etilo o acetonitrilo, empleando un solo ciclo a 130°C y 2000 psi durante 10 minutos. Los extractos, concentrados a sequedad para realizar el cambio de disolvente, fueron reconstituídos con 2 mL de acetato de etilo, derivatizando una alícuota de 500 µL con 40 µL de MTBSTFA durante una hora a 70°C. Los resultados obtenidos se muestran en la figura I.6.

Figura I.6. Eficacia de extracción para diclorometano, acetato de etilo y acetonitrilo (N=3). Respuestas normalizadas frente a acetato de etilo.



Como se observa en la figura I.6, el diclorometano fue el disolvente que presentó menor afinidad por los compuestos. Para acetato de etilo y acetonitrilo, la eficacia de extracción es función de las características de los analitos. Los más polares, MeP, EtP y PrP (Log K_{ow} 1.9, 2.4 y 2.9, respectivamente) mostraron una mayor afinidad por el acetonitrilo (más polar que el acetato de etilo), mientras que el BuP y TCS (Log K_{ow} 3.5 y 4.8) se extrajeron en mayor extensión con acetato de etilo. Dado que el acetato de etilo es más fácil de concentrar mediante evaporación que el acetonitrilo, se seleccionó finalmente como disolvente de extracción.

1.3.2.2. Temperatura, tiempo y masa de co-adsorbente

Una vez establecido el disolvente de elución, los valores correspondientes a temperatura, tiempo de extracción, así como masa de Florisil situado en la parte inferior en la celda como adsorbente para la retención de interferencias polares, han sido optimizados simultáneamente con un diseño experimental central compuesto (CCD) tipo 2^3 con 6 puntos estrella situados a una distancia axial de $\alpha=1.68$. El número de puntos centrales fue de nueve para tener un diseño

ortogonal y rotatable. Los valores extremos para los factores temperatura, tiempo y masa de co-adsorbente explorados en el diseño fueron 70-180 °C, 1-19 minutos y 0-2 g, respectivamente.

En todos los experimentos la masa total de Florisil en la celda de extracción, considerando la cantidad de dispersante más la cantidad usada como co-adsorbente, se mantuvo en 4 g. La presión de trabajo se fijó en 2000 psi (13.8 MPa), suficiente para mantener el disolvente en estado líquido dentro de la celda, mientras que el número de ciclos, el volumen de *flush* y la purga de nitrógeno se fijaron en 1, 100 % y 60 segundos, respectivamente.

Una vez realizadas las 23 extracciones, en las condiciones descritas en la tabla I.4, se analizaron los extractos mediante GC-MS/MS, obteniendo los siguientes resultados.

Tabla I.4. Condiciones de extracción y resultados (áreas de pico) obtenidos para el diseño experimental central compuesto.

Exp	Temp (°C)	Tiempo (min)	Co-adsorbente (g)	MeP	EtP	PrP	BuP	TCS
1	92	15.3	1.6	135929	44689	73782	33193	164254
2	125	10	2	129934	38969	70240	33717	137929
3	158	4.7	0.4	176215	52679	77508	33810	90158
4	125	1	1	164910	54029	88373	39284	152992
5	70	10	1	113152	39899	70569	37291	205416
6	125	10	1	159437	47251	78291	38697	162794
7	125	10	1	185439	59740	83262	40810	135083
8	125	10	1	192999	58385	84221	32803	139148
9	92	15.3	0.4	167593	53735	85501	40040	153719
10	125	19	1	156991	46300	70614	33317	165208
11	125	10	1	183301	51979	82352	35751	198693
12	92	4.7	0.4	153562	49683	75254	31909	174008
13	92	4.7	1.6	157553	52723	85592	38393	206420
14	158	4.7	1.6	164083	45740	65334	29771	112129
15	180	10	1	160886	43501	59774	23372	69899
16	125	10	1	173145	49024	78073	32584	177100
17	125	10	1	195747	60773	88360	36530	160151
18	158	15.3	1.6	198822	53355	71459	30289	112555
19	125	10	1	207497	64448	89157	39469	195846
20	125	10	1	191656	57142	78794	34479	160582

Exp	Temp (°C)	Tiempo (min)	Co-adsorbente (g)	MeP	EtP	PrP	BuP	TCS
21	158	15.3	0.4	207336	56411	83128	34314	78863
22	125	10	0	149781	42424	67458	30554	96820
23	125	10	1	149015	47545	80104	36700	143942

Una vez tratados los datos anteriores con el programa estadístico Statgraphics Centurión XV.I, se obtuvieron los efectos principales, los términos cuadráticos y las interacciones entre dos factores que se muestran en la tabla I.5.

Tabla I.5. Valores normalizados para los efectos principales, los términos cuadráticos y las interacciones de orden dos correspondientes al diseño tipo CCD.

	MeP	EtP	PrP	BuP	TCS
A: Temperatura (°C)	2.92 ^a	0.62	-1.68	-3.23 ^a	-7.29 ^a
B: Tiempo (min)	0.66	-0.19	-0.78	-0.45	-0.69
C: Co-adsorbente (g)	-1.10	-0.91	-0.90	-0.26	2.30 ^a
AA	-2.02	-1.91	-2.97 ^a	-2.33 ^a	-1.84
AB	1.39	0.92	0.88	-0.11	0.97
AC	0.19	-0.15	-1.17	-0.77	0.31
BB	-0.38	-0.11	0.21	0.28	-0.32
BC	-0.52	-0.39	-1.13	-1.40	-0.09
CC	-1.83	-2.14	-2.14	-1.53	-3.29 ^a

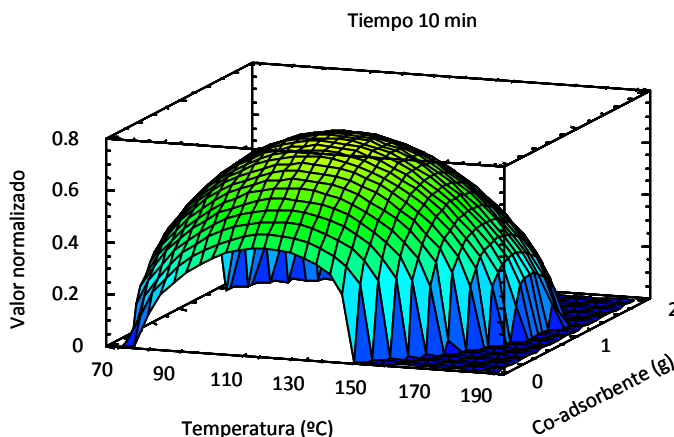
^aFactores estadísticamente significativos a un nivel de confianza de 95 %.

La variable tiempo no afectó en gran medida a la eficacia del proceso de extracción. La temperatura jugó un papel más importante, siendo estadísticamente significativa para el MeP, el BuP y TCS. Para los dos últimos, el rendimiento de la extracción disminuyó a temperaturas elevadas, mientras que para el MeP se observó el efecto contrario. Por otra parte, el término cuadrático asociado con la temperatura también resultó significativo para PrP y BuP, lo que sugiere que la variación en la eficacia de extracción no sigue un modelo lineal dentro del dominio experimental considerado para esta variable. Dado que la viscosidad de los líquidos disminuye al aumentar la temperatura, cabe esperar que la solubilidad de los analitos en el disolvente de extracción, y por tanto la eficacia de ésta, aumente con la temperatura, sin embargo, para algunos compuestos se ha descrito un comportamiento opuesto, coincidente con el observado en este trabajo para BuP y TCS [Petrovic M; 2002][Concha-Graña E; 2004][Rodil R; 2006]. Pérdidas por evaporación de los compuestos cuando el extracto caliente es transferido desde la celda de extracción al vial colector y/o degradación térmica de los analitos en la celda de PLE podrían explicar la reducción en la eficacia

de extracción al aumentar la temperatura de la celda. En este caso concreto, para el BuP y para el TCS, las pérdidas por evaporación no pueden justificar esta disminución, puesto que son los menos volátiles de los cinco compuestos estudiados. Con respecto a la masa de co-adsorbente, sólo fue estadísticamente significativa para el triclosán, al igual que el término cuadrático asociado a la misma. Por último, las interacciones entre factores no alcanzaron el nivel de significación estadística (95 % de confianza) para ninguno de los analitos considerados.

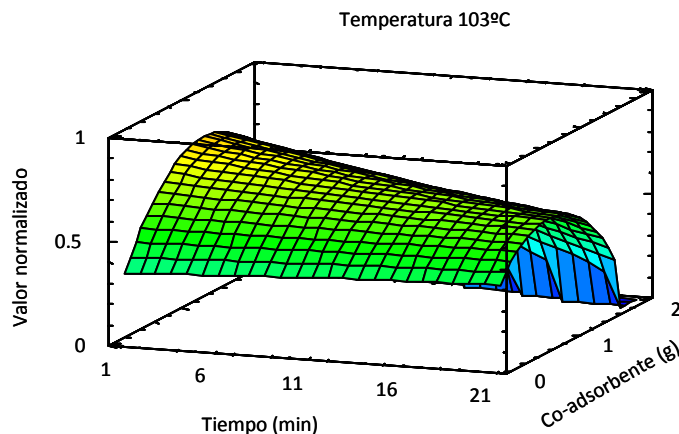
Puesto que las condiciones óptimas de extracción (sobre todo en lo referente a la temperatura de la celda) fueron diferentes para MeP frente a los compuestos más apolares (BuP y TCS) se utilizó una función de deseabilidad global para estimar las mejores condiciones de trabajo para el conjunto de los cinco analitos considerados. En primer lugar, las respuestas obtenidas para cada analito en los diferentes experimentos implicados en el diseño tipo CCD, han sido normalizadas entre 0 y 1. A continuación, la función de deseabilidad global se ha definido en base a su media geométrica. La representación de esta función frente a la temperatura y masa de co-adsorbente, considerando el tiempo de extracción en el valor central del diseño (10 minutos), se muestra en la figura I.7.

Figura I.7. Representación de la función de deseabilidad global temperatura-cantidad de co-adsorbente para un tiempo de extracción de 10 minutos.



Como se puede observar, el máximo corresponde a una temperatura de 103°C y una cantidad de co-adsorbente de 1 g. Para el valor óptimo de temperatura, el tiempo de extracción que proporcionó mejores resultados correspondió a 1 minuto, figura I.8.

Figura I.8. Función de deseabilidad global tiempo-masa de co-adsorbente para una temperatura de 103°C.



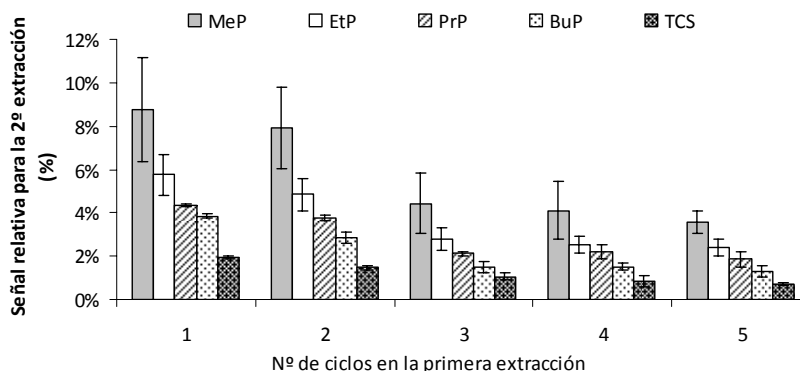
En consecuencia, las condiciones finales de extracción seleccionadas fueron 103°C, 1 minuto de tiempo de extracción, 1 g de Florisil como co-adsorbente en la celda de extracción, y, por lo tanto, 3 g del mismo material dispersante.

1.3.2.3. Ciclos de extracción

El número de ciclos de extracción por muestra, definido como el número de etapas de extracción estática que se aplica sobre una misma celda con una porción fresca de disolvente, fue el último parámetro a optimizar.

Para evaluar el efecto de este factor, se extrajeron una serie de muestras considerando un número creciente de ciclos (de 1 a 5), en las condiciones óptimas estimadas anteriormente. Tras cada ciclo de extracción, la celda fue lavada con un volumen de acetato de etilo equivalente al volumen total de *flush* (100 % del volumen de la celda) dividido entre el número de ciclos. Los extractos obtenidos, usando un número creciente de ciclos, se etiquetaron como fracción 1. Después del último ciclo de extracción las celdas fueron purgadas y despresurizadas. A continuación, se volvieron a extraer aplicando un único ciclo de 1 minuto, recogiendo el extracto en un segundo vial etiquetado como fracción 2. Ambas fracciones fueron concentradas a 2 mL y, una vez derivatizadas, analizadas mediante GC-MS/MS. En la figura I.9, se representa las respuestas relativas (área de pico para la segunda fracción frente a la suma de las respuestas para ambas) para cada compuesto en función del número de ciclos implicados en la primera extracción.

Figura I.9. Respuesta relativa obtenida en la re-extracción de las muestras frente al número de ciclos considerados en la primera extracción, 103°C, 13.8 MPa y 1 minuto (N=2).



Cuando se aplicaron 3 ó más ciclos, la señal relativa para las segundas fracciones fue inferior al 5 % del total para todos los compuestos. Además, no se observó una reducción muy significativa en la respuesta obtenida para la segunda fracción, considerando un número mayor de ciclos en la primera, por tanto, su número se limitó a tres.

1.3.3. Optimización de las condiciones de derivatización

Las condiciones de derivatización utilizadas hasta ahora fueron las consideradas para la sililación de los extractos de agua residual. Dada la mayor complejidad de los extractos de polvo se consideró oportuno re-optimizar las condiciones de derivatización.

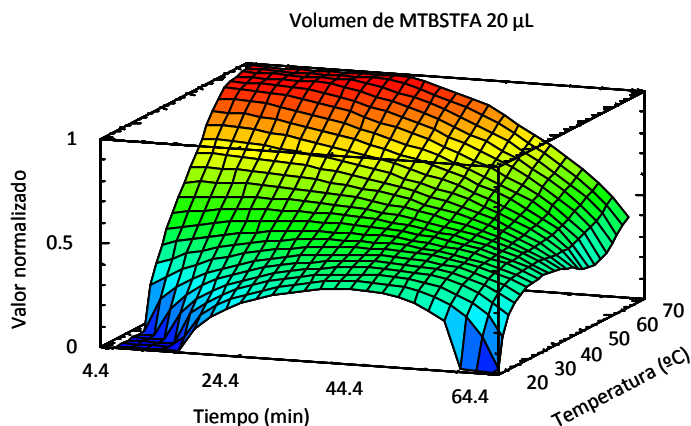
Para la realización de este estudio, se empleó una mezcla de extractos obtenidos mediante PLE para fracciones de una muestra de polvo con adición de EtP y BuP a nivel de 300 ng/g. Alícuotas de 0.5 mL del *pool* de extractos se derivatizaron en diferentes condiciones de temperatura, volumen de MTBSTFA y tiempo. De nuevo se utilizó un diseño experimental factorial del tipo CCD, ortogonal y rotatable, para estudiar el dominio experimental de trabajo de forma exhaustiva, tabla I.6. El análisis de las respuestas obtenidas condujo a los efectos principales que se muestran en la tabla I.6.

Tabla I.6. Dominio experimental y efectos principales estandarizados para volumen de derivatizante, tiempo y temperatura para el diseño tipo CCD.

Factores	Dominio experimental					Efectos estandarizados				
	-1.68	-1	0	+1	+1.68	MeP	EtP	PrP	BuP	TCS
A: Vol. (μL)	20	36	60	84	100	-0.92	-0.39	-0.31	0.72	-1.15
B: Tiempo (min)	4	13	33	50	62	0.77	0.94	1.64	0.73	-0.21
C: Temp. ($^{\circ}\text{C}$)	20	30	45	60	70	0.99	1.37	0.77	0.97	-0.24

Ninguno de los factores resultó ser estadísticamente significativo a un nivel de confianza de 95 %. De todos modos, la elección de las condiciones de trabajo se hizo en base a la función global de deseabilidad obtenida para los cinco compuestos, figura I.10. Considerando un volumen mínimo de derivatizante (20 μL), la superficie de respuesta para la función de deseabilidad global permitió visualizar los valores óptimos de temperatura y tiempo. Las condiciones de derivatización seleccionadas fueron 20 μL de MTBSTFA, 65 $^{\circ}\text{C}$ y 5 minutos.

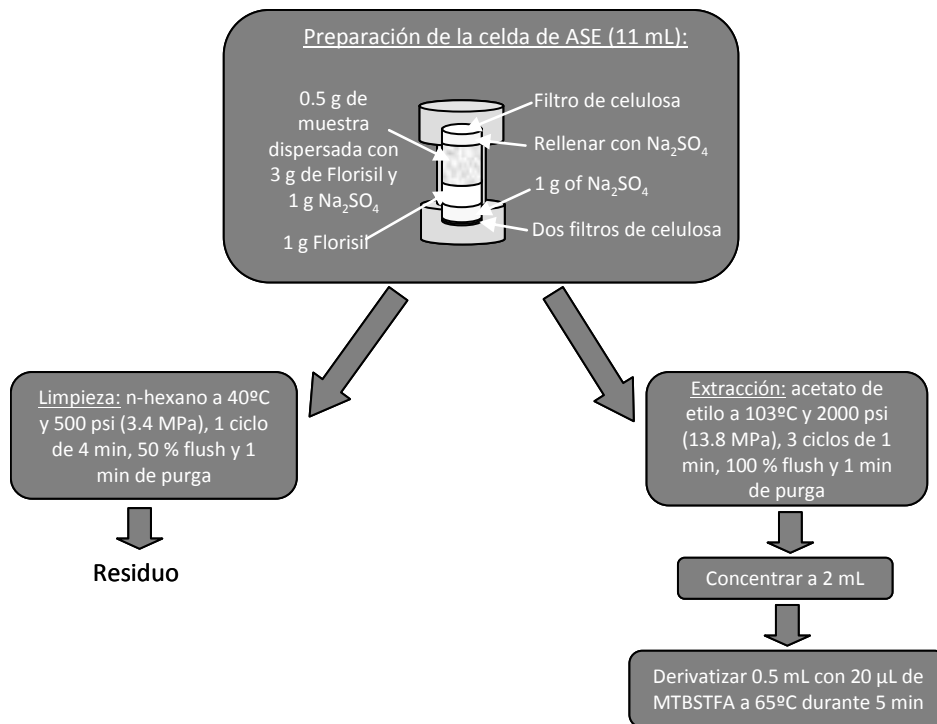
Figura I.10. Superficie de respuesta para la función de deseabilidad global correspondiente a la derivatización de extractos de polvo.



1.3.4. Caracterización del método analítico

Una vez fijadas las condiciones de preparación de muestra (figura I.11), se procedió a la caracterización analítica del método desarrollado, usando GC-MS/MS como técnica de determinación.

Figura I.11. Condiciones óptimas de extracción (PLE) y derivatización para la determinación de parabenos y triclosán en muestras de polvo.



1.3.4.1. Caracterización del método de determinación (GC-MS/MS): linealidad, repetibilidad y LOQs

El rango de respuesta lineal del equipo (GC-MS/MS) fue evaluado con una serie de 10 patrones, preparados en acetato de etilo, en un intervalo de concentraciones comprendido entre 2 ng/mL y 1.5 µg/mL.

Para el cálculo de los límites de cuantificación del sistema cromatográfico se inyectaron patrones de concentraciones comprendidas entre 0.1 y 1 ng/mL, obteniendo las relaciones señal-ruido de los picos correspondientes a cada analito. A concentraciones próximas a los LOQs e intermedias en el rango de calibrado, se estimó la variabilidad de la respuesta del equipo. Los resultados referentes a los parámetros que caracterizan el sistema GC-MS/MS utilizado, se muestran en la tabla I.7.

Tabla I.7. Linealidad, repetibilidad y LOQs del equipo GC-MS/MS empleado en este estudio. Columna CP-Sil8 Low Bleed.

		MeP	EtP	PrP	BuP	TCS
<i>Linealidad</i>	R^2	0.998	0.994	0.996	0.996	0.997
<i>Repetibilidad</i> (% RSD, n=5)	8 ng/mL	9.9	6.8	4.0	4.1	3.8
	500 ng/mL	6.5	4.8	3.4	4.3	3.5
	<i>LOQ (ng/mL)^a</i>	0.4	0.5	0.6	0.6	0.3

^aColumna CP-Sil8 Low Bleed

1.3.4.2. Exactitud, precisión y límites de cuantificación del método analítico

La precisión intra-día (repetibilidad) e inter-día (reproducibilidad) del procedimiento propuesto fue estudiada con una muestra de polvo, sin adición, en la que se detectó la presencia de todos los analitos. Para el estudio de repetibilidad se llevó a cabo la extracción de la muestra por cuadruplicado dentro de un mismo día, mientras que para evaluar la reproducibilidad, la misma muestra fue extraída por triplicado cuatro días consecutivos. Los resultados, expresados como coeficientes de variación, mostraron valores inferiores al 8 % y 11 % respectivamente, tabla I.8.

Tabla I.8. Repetibilidad (N=4), reproducibilidad (N=12), recuperación (N=4) y LOQs del método analítico propuesto.

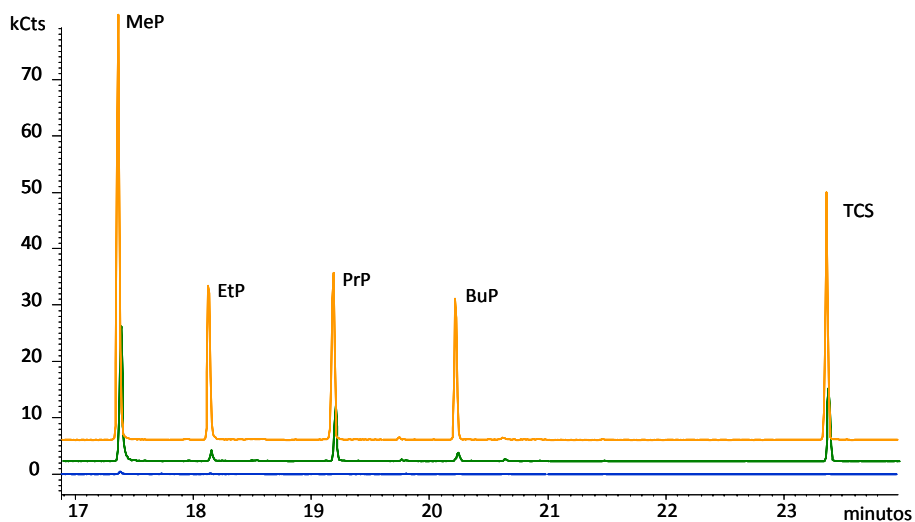
Analito	Repetibilidad (% RSD, n=4)	Reproducibilidad (% RSD, n=12)	Recuperación ± SD		LOQ (ng/g)
			Muestra 1 (TOC 18%)	Muestra 2 (TOC 20%)	
<i>MeP</i>	5.0	6.1	98±5	94±8	1.6
<i>EtP</i>	5.8	10.6	85±6	88±6	2.2
<i>PrP</i>	4.7	9.7	86±7	84±10	2.9
<i>BuP</i>	8.4	10.3	93±4	76±13	3.6
<i>TCS</i>	6.6	8.6	92±5	93±10	1.2

La exactitud del método propuesto fue evaluada con dos muestras de polvo, una procedente de un edificio público (TOC 18 %) y otro de una vivienda particular (TOC 20 %). Cada muestra fue dividida en dos fracciones. Una de ellas fue enriquecida con 500 ng/g de los analitos. La

recuperación se calculó como la diferencia de valores obtenidos para las fracciones con adición y sin adición, dividida por la concentración añadida, tabla I.8. En general, las recuperaciones obtenidas para ambas muestras presentaron valores superiores al 85 %, con variaciones inferiores al 13 %, por lo que se puede afirmar que el método permite extraer los analitos cuantitativamente.

Por último, los límites de cuantificación del método analítico se estimaron considerando los blancos del proceso, así como los límites de cuantificación proporcionados por el equipo de GC-MS/MS. Teniendo en cuenta que no se ha detectado la presencia de los compuestos en los blancos y la cantidad de muestra de partida fue de 0.5 g, los LOQs fueron inferiores a 4 ng/g. En la figura I.12 se muestra un cromatograma referente a la muestra número 1 (tabla I.8) con y sin adición, así como el blanco del proceso.

Figura I.12. Cromatogramas (m/z 177+151+195+200+310) de GC-MS/MS para la muestra 1 (tabla I.8) con (naranja) y sin adición (verde), así como un blanco de proceso (azul).



1.4. Extracción mediante dispersión de la matriz en fase sólida

Adicionalmente a PLE, se evaluaron las posibilidades que ofrece la dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) para la extracción conjunta de parabenos (MeP, EtP, PrP y BuP) y TCS en muestras de polvo. Esta técnica presenta un bajo coste, una gran sencillez y una considerable selectividad derivada de la posibilidad de integrar, al igual que en el caso de PLE, etapas de purificación en línea con el proceso de extracción, además de emplear condiciones mucho más suaves (temperatura ambiente y presión atmosférica) que PLE. En este capítulo se describe la optimización sistemática del proceso de MSPD, con el objeto de maximizar la selectividad y eficacia de la preparación de muestra. Como técnica de determinación se ha usado de nuevo GC-MS/MS y, en algunos casos, GC-MS.

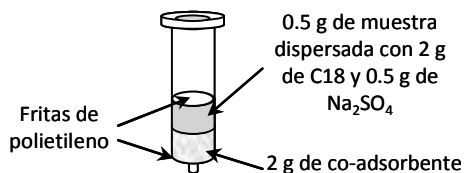
1.4.1. Optimización de las condiciones de extracción

Los factores que afectan a la eficacia de extracción en MSPD fueron optimizados mediante el empleo de diseños experimentales factoriales, así como usando estudios univariantes para determinados factores. La elección de C18 como agente dispersante fue un parámetro fijado de antemano, ya que es el adsorbente empleado en la mayoría de las aplicaciones de MSPD [Barker SA; 2007].

1.4.1.1. Elección del co-adsorbente

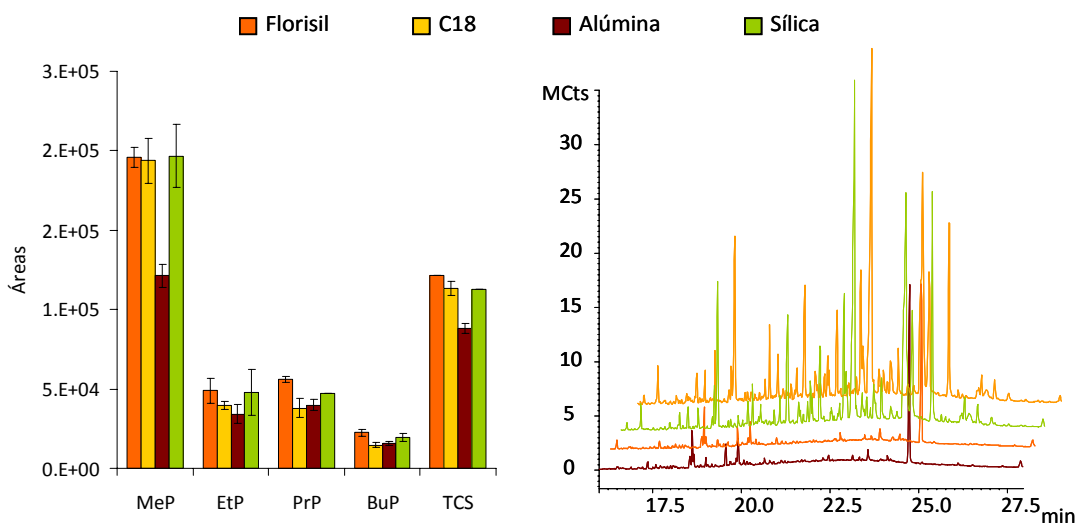
Como primer paso en la optimización de las condiciones de extracción se estudió la influencia de diferentes co-adsorbentes en el perfil cromatográfico obtenido en GC-MS para extractos de muestras de polvo. Los materiales estudiados fueron el Florisil (60-100 mesh), alúmina (150 mesh), C18 (70-230 mesh) y sílica (230-400 mesh). Los adsorbentes en fase normal se activaron a 130°C durante 48 horas, eliminando así las moléculas de agua que pueden estar retenidas en la superficie de sus partículas. En todos los casos se emplearon 2 g de co-adsorbente situados bajo 0.5 g de muestra (polvo tamizado a 60 µm y fortificado con los analitos a nivel de 100 ng/g) previamente dispersada en un mortero con sulfato sódico anhidro y 2 g de C18, figura I.13.

Figura I.13. Disposición de la muestra en el cartucho de MSPD.



La elución de los analitos se realizó con 20 mL de acetato de etilo. Una vez concentrado a 1 mL, se filtró para evitar la presencia de partículas en el extracto final. Una alícuota del filtrado (500 μ L) fue derivatizada con MTBSTFA e inyectada en GC-MS.

Figura 1.14. Áreas de pico y perfiles cromatográficos para extractos de una muestra de polvo en función del co-adsorbente (N=3).



Como se puede comprobar, figura 1.14, la señal de los compuestos es prácticamente idéntica en todos los experimentos con excepción de MeP y TCS, utilizando la alúmina como co-adsorbente. Los cromatogramas de GC-MS presentan menor complejidad para Florisil y alúmina, frente al C18 y sílica, por lo que finalmente se continuó trabajando sólo con los dos primeros materiales como co-adsorbentes.

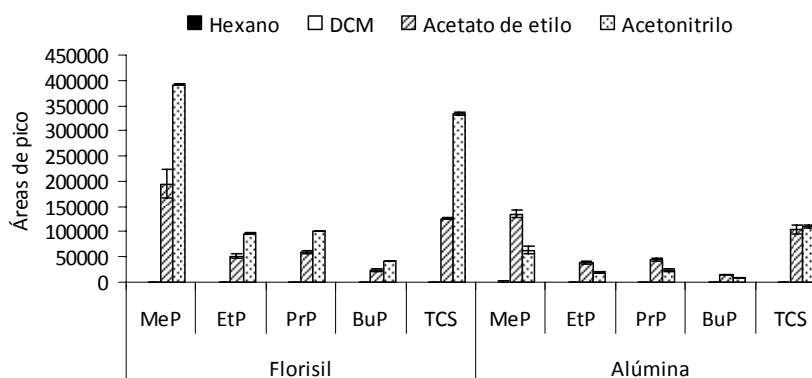
1.4.1.2. Disolvente de elución

La eficacia de extracción se evaluó considerando cuatro disolventes con polaridades crecientes (hexano, diclorometano, acetato de etilo y acetonitrilo) usando Florisil y alúmina como co-adsorbentes. Al igual que en el apartado anterior, la muestra fue dispersada previamente con 2 g de C18. El volumen de disolvente se fijó en 20 mL. Con objeto de evitar cambios aparentes en la eficacia del proceso de preparación de muestra, derivados de variaciones en el rendimiento de la

sililación para extractos en diferentes disolventes, todos los extractos fueron concentrados a sequedad y reconstituidos con 1 mL de acetato de etilo previamente a la adición del agente sililante.

Los resultados obtenidos, como áreas de pico, se muestran en la figura I.15 para cada disolvente y co-adsorbente.

Figura I.15. Áreas de pico en función del co-adsorbente y el disolvente de elución utilizado en MSPD (N=3).



En general, los resultados representados en la figura I.15 siguen la misma tendencia que los observados para PLE. Por un lado, hexano y diclorometano no fueron capaces de recuperar los analitos. Por otro, en acuerdo con la información presentada en la tabla I.3 y la figura I.14, la alúmina resultó más retentiva que el Florisil, por lo que se prefirió el primer material como co-adsorbente en el cartucho de MSPD. Aunque para Florisil se obtuvieron mayores respuestas usando acetonitrilo que con acetato de etilo, la elección del disolvente de elución se reservó para etapas posteriores.

Ni hexano ni diclorometano permitieron recuperar los analitos de la matriz, sin embargo los cromatogramas obtenidos presentaron una gran complejidad, especialmente para los extractos en diclorometano. Por ello, se consideró la posibilidad de realizar un lavado previo del cartucho con diclorometano, para a continuación proceder a la elución de los compuestos usando acetonitrilo. Planteada esta estrategia, se preparó un cartucho de MSPD dispersando 0.5 g de muestra con 0.5 g de sulfato sódico anhidro y 2 g de C18, con 2 g de Florisil como co-adsorbente. En una primera fracción, se recogieron 10 mL de diclorometano y a continuación, tras el secado del cartucho a vacío, se recuperaron los analitos con 10 mL de acetonitrilo. Una segunda muestra fue procesada en condiciones idénticas pero sin considerar la etapa de lavado. Los cromatogramas de corriente iónica total (TIC), incluso usando adquisición en modo MS/MS, mostraron claramente los beneficios de la etapa de lavado, figuras I.16 y I.17.

Figura I.16. Cromatogramas de GC-MS (TIC) para las fracciones de diclorometano y acetonitrilo obtenidas de una muestra de polvo.

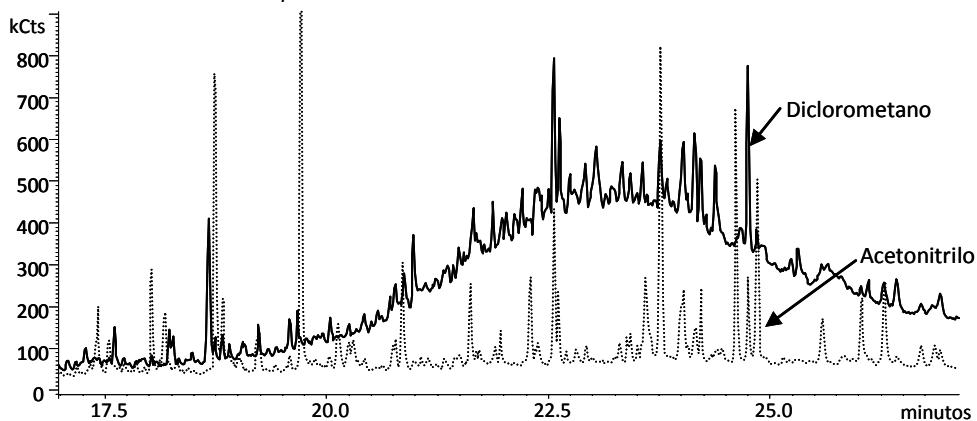
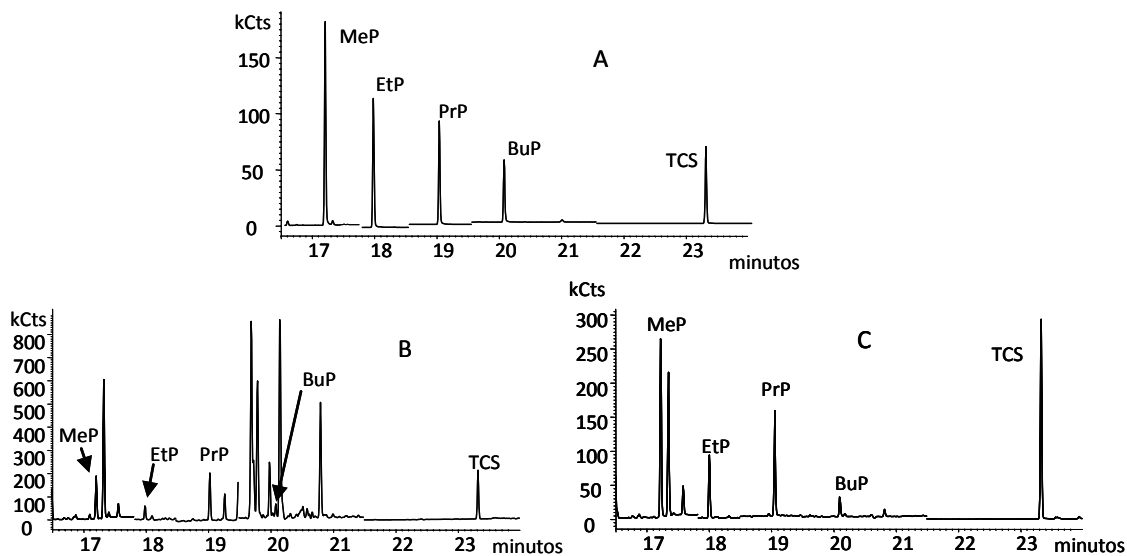


Figura I.17. Cromatogramas de GC-MS/MS (TIC) para un patrón en acetonitrilo (A), un extracto de MSPD en acetonitrilo sin limpieza previa (B) y un extracto de MSPD en acetonitrilo con lavado previo del cartucho usando diclorometano (C).



1.4.1.3. Optimización de la masa de dispersante, disolvente de elución y volumen

La cantidad de dispersante (C18), el tipo de eluyente (acetato de etilo o acetonitrilo) y

volumen del mismo fueron optimizados mediante un diseño factorial mixto tipo 3×2^2 con dos puntos centrales, tabla I.9.

Tabla I.9. Dominio experimental del diseño factorial 3×2^2 .

Factor	Bajo	Medio	Alto
Volumen eluyente (mL)	5	15	25
Masa C18 (g)	0.5		2
Eluyente	Acetato de etilo		Acetonitrilo

Los 14 experimentos del diseño fueron llevados a cabo con una mezcla 1:1 de dos muestras de polvo procedentes de dos viviendas diferentes. Sus contenidos de carbono orgánico fueron de 24.7 % y 25.6 %, respectivamente. Dado que las concentraciones nativas de EtP y BuP en la muestra compuesta eran muy bajas, ésta se fortificó con ambos compuestos a nivel de 300 ng/g. A continuación se dejó envejecer a temperatura ambiente un periodo de 10 días antes de proceder a su extracción.

Los cartuchos de MSPD se prepararon usando 2 g de Florisil como co-adsorbente, dispersando 0.5 g del *pool* anterior con 0.5 g de sulfato sódico anhidro y la cantidad de C18 descrita en cada experimento. Tras el lavado de los cartuchos con 10 mL de diclorometano, se eluyeron con el volumen indicado de acetonitrilo o acetato de etilo. Todos los extractos, incluidos los de diclorometano, fueron concentrados a sequedad y reconstituidos con 1 mL de acetato de etilo. Una vez derivatizados, fueron inyectados, junto con un calibrado para su cuantificación, en el sistema GC-MS/MS. En ninguna de las fracciones de diclorometano, se detectó la presencia de los analitos, confirmando que no existen pérdidas en la etapa de lavado. La matriz de experimentos, junto con las concentraciones obtenidas para cada ensayo, se presenta en la tabla I.10.

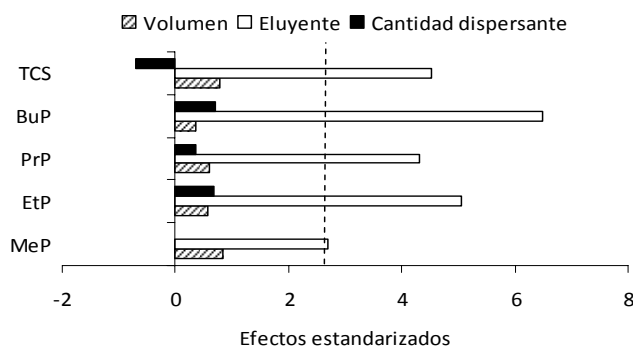
Tabla I.10. Experimentos realizados en el diseño de MSPD (3×2^2) y respuestas (concentración en ng/g) obtenidas para cada compuesto.

Exp.	Vol. (mL)	C18 (g)	Eluyente	MeP	EtP	PrP	BuP	TCS
1	15	1.25	AcN	545.9	320.1	660.5	476.4	852.6
2	25	0.5	AcN	504.0	288.7	613.4	387.1	867.5
3	15	0.5	AcOEt	470.8	150.6	431.1	258.0	398.7
4	15	2	AcOEt	465.1	87.3	469.5	248.3	700.5
5	15	0.5	AcN	629.2	392.1	748.8	525.3	992.3
6	15	2	AcN	691.5	408.1	782.4	552.4	1012.4
7	5	0.5	AcN	372.9	191.1	527.3	396.4	1048.1
8	25	2	AcOEt	395.8	105.6	388.6	226.8	476.6

Exp.	Vol. (mL)	C18 (g)	Eluyente	MeP	EtP	PrP	BuP	TCS
9	15	1.25	AcOEt	485.4	288.6	471.9	224.9	306.6
10	5	2	AcN	721.0	458.8	979.8	744.5	928.9
11	5	2	AcOEt	25.0	9.1	16.3	8.6	12.2
12	25	2	AcN	572.2	361.6	796.5	564.4	1108.5
13	25	0.5	AcOEt	429.6	127.8	451.6	311.3	714.6
14	5	0.5	AcOEt	473.5	88.9	477.9	252.8	713.2

Usando el programa estadístico Statgraphics 5.1, se obtuvieron los efectos estandarizados de cada variable, así como las interacciones entre factores. La carta Pareto para los efectos principales, junto con el nivel de significación a un 95 % de confianza (línea vertical), se muestran en la figura I.18.

Figura I.18. Carta Pareto con los efectos principales asociados a los factores del diseño experimental.



Como se observa en la gráfica anterior, el disolvente de elución fue el único factor estadísticamente significativo (95 % de confianza). De nuevo se confirmó que el acetonitrilo proporcionaba mejores rendimientos que el acetato de etilo. La cantidad de dispersante prácticamente no afectó a la eficacia de extracción, seleccionando finalmente el valor medio del dominio experimental para esta variable, 1.25 g de C18.

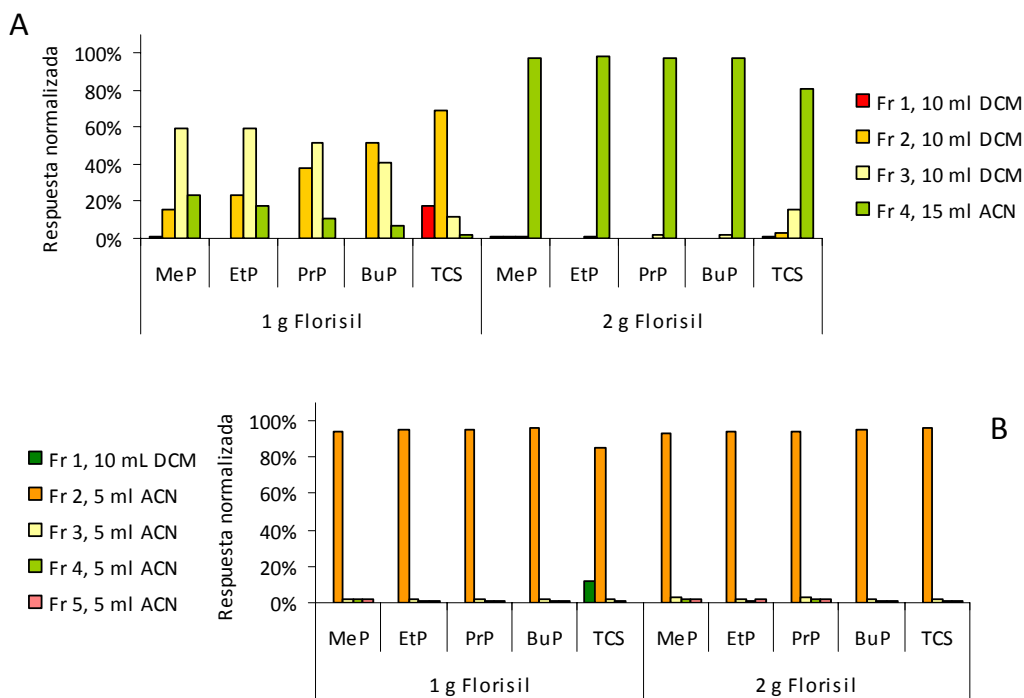
El volumen de eluyente tampoco fue un factor significativo, por lo que, a priori, se podrá mantener en el nivel bajo del diseño (5 mL); sin embargo, su valor óptimo se estableció en un estudio posterior, conjuntamente con la masa de co-adsorbente.

1.4.1.4. Masa de co-adsorbente y volúmenes de disolventes de lavado y elución

La masa de Florisil (co-adsorbente en la columna de MSPD), así como los volúmenes de diclorometano y acetonitrilo fueron estudiados conjuntamente como último paso en la optimización

de las condiciones de extracción. Se llevaron a cabo dos series de experimentos usando 1 y 2 g de Florisil como co-adsorbente. En la primera se evaluó el volumen máximo de disolvente de lavado, pasando a través de los cartuchos de MSPD tres fracciones consecutivas de diclorometano (10 mL cada una) y una última de 15 mL de acetonitrilo. En la segunda serie, se estudió el volumen mínimo de acetonitrilo para eluir cuantitativamente los analitos. Se recogió una única fracción de 10 mL de diclorometano, y tras el secado de los cartuchos, cuatro fracciones consecutivas de 5 mL de acetonitrilo. Todas las fracciones fueron concentradas a sequedad y re-constituidas con acetato de etilo para su posterior análisis mediante GC-MS/MS. Los resultados obtenidos se muestran en la figura I.19, donde se representa señal relativa para cada fracción frente a la suma de señales de todas las fracciones recogidas.

Figura I.19. Distribución de los analitos entre las fracciones de diclorometano (A) y acetonitrilo (B), usando 1 y 2 g de Florisil como co-adsorbente. Datos para extracciones en duplicado.



El volumen de diclorometano necesario para eluir las interferencias, sin que haya pérdidas de los compuestos estudiados, ha sido dependiente del analito y de la masa de co-adsorbente. El triclosán, el más lipofílico de los compuestos estudiados, aparece en la primera fracción de diclorometano cuando se utilizó 1 g de co-adsorbente, mientras que, usando 2 g de Florisil, fueron

necesarias dos fracciones de 10 mL de diclorometano para detectar pérdidas de este compuesto (figura I.19 A). Para los parabenes, el perfil de elución fue más lento que para el triclosán, apreciándose la señal de estos compuestos en la segunda y tercera fracción de 10 mL de diclorometano para 1 g de Florisil, mientras que no hubo pérdidas significativas en las fracciones de lavado cuando la cantidad de co-adsorbente fue de 2 g (figura I.19 A).

Con respecto al disolvente de elución, tanto considerando 1 como 2 g de Florisil, fue posible recuperar el 95 % de todos los analitos con una única fracción de 5 mL de acetonitrilo (figura I.19 B), aunque finalmente se seleccionaron 10 mL para asegurar la recuperación cuantitativa de los compuestos.

En base a estos datos la cantidad de co-adsorbente (Florisil) se mantuvo en 2 g, mientras que los volúmenes de diclorometano y acetonitrilo se fijaron en 10 mL.

1.4.2. Optimización de las condiciones de derivatización en acetonitrilo

El acetonitrilo resultó un disolvente adecuado para la extracción de los analitos de muestras de polvo. Para evitar la etapa de cambio de disolvente, en el proceso de tratamiento de muestra, se optimizó la derivatización de los compuestos en acetonitrilo. La influencia de la temperatura (20-45-70°C), el volumen de agente derivatizante (20-100 µL) y el tiempo de derivatización (5-60 minutos) fueron estudiados utilizando un diseño factorial mixto 3×2^2 , con dos puntos centrales. Para llevar a cabo los experimentos, se utilizó un *pool* de extractos en acetonitrilo, correspondientes a muestras de polvo procesadas mediante MSPD. Los valores estandarizados para los efectos principales correspondientes a las variables anteriores se muestran en la tabla I.11, así como aquellos factores que son estadísticamente significativos al 95 % de confianza.

Tabla I.11. Dominio experimental y valores estandarizados de los efectos principales para el diseño de derivatización en acetonitrilo.

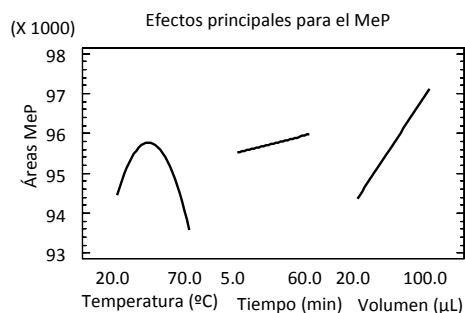
Factor	Dominio experimental			Efectos principales				
	Bajo	Medio	Alto	MeP	EtP	PrP	BuP	TCS
Temperatura (°C)	20	45	70	-0.52	0.83	-0.05	-0.77	-0.24
Tiempo (min)	5		60	0.35	-1.31	-0.68	0.90	-1.72
Volumen (µL)	20		100	2.05 ^a	1.03	1.54	3.29 ^a	7.91 ^a

^aFactores estadísticamente significativos a un nivel de confianza de 95 %

Sólo el volumen de derivatizante resultó ser una variable estadísticamente significativa para tres de los compuestos estudiados (MeP, BuP y TCS). El signo positivo indica que son necesarios volúmenes elevados de MTBSTFA para tener buenos rendimientos en la etapa de derivatización. Las

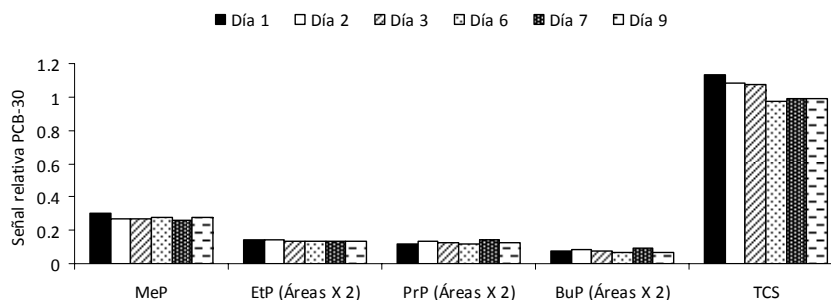
otras dos variables afectaron en menor medida al proceso de derivatización y sus efectos no alcanzaron el límite de significación estadística. Sin embargo, el término cuadrático asociado a la temperatura fue relativamente importante, principalmente en el caso del MeP. El gráfico de efectos principales para este analito, figura I.20, reveló una importante curvatura en su respuesta con un máximo a 45°C.

Figura I.20. Gráfico de efectos principales para el MeP.



En base a estos resultados, la derivatización se llevó a cabo a 45°C con 100 µL de MTBSTFA durante 5 minutos. En estas condiciones, se evaluó la estabilidad temporal de los compuestos terbutildimetilsililados en acetonitrilo, para lo cual se derivatizó un extracto de muestra de polvo, obtenido mediante MSPD y se inyectó en distintos días, utilizando el PCB-30 como patrón interno de inyección. Los resultados obtenidos (señales relativas al patrón interno), se representan en la figura I.21.

Figura I.21. Estabilidad temporal de los analitos sililados en el extracto de una muestra de polvo.

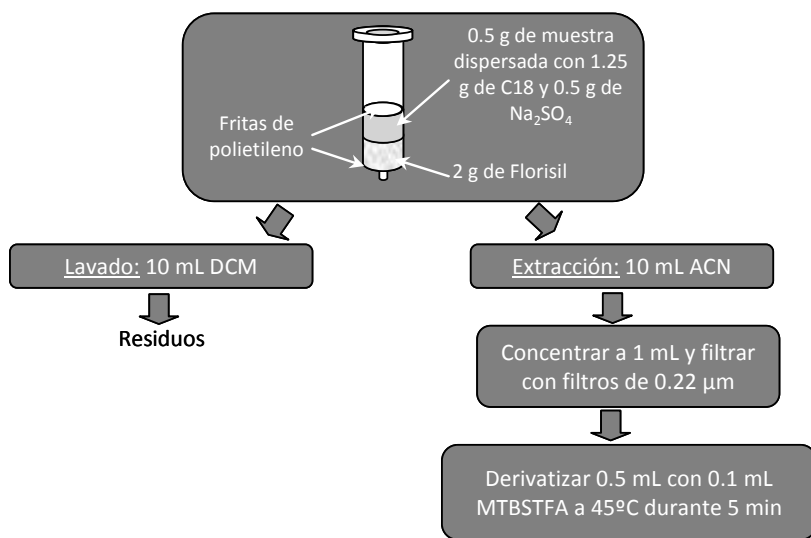


Como se muestra en la figura anterior, los compuestos derivatizados en acetonitrilo fueron estables, al menos durante 9 días, lo que permite su re-inyección en caso necesario.

1.4.3. Caracterización del método analítico

El método propuesto para la extracción de parabenos y triclosán en muestras de polvo englobó una preparación de la muestra sencilla basada en la dispersión de la matriz en fase sólida, con una etapa previa de lavado para eliminar especies poco polares y posterior extracción de los analitos con 10 mL de acetonitrilo (figura I.22). Este extracto fue concentrado a 1 mL y una fracción del mismo (0.5 mL) sililado en las condiciones descritas en el apartado anterior. La figura I.22 muestra un esquema del método propuesto.

Figura I.22. Esquema de extracción-derivatización en MSPD.



Una vez optimizada la preparación de las muestras empleando MSPD se procedió a la caracterización analítica del método desarrollado.

1.4.3.1. Caracterización del método de determinación (GC-MS/MS): linealidad, repetibilidad y LOQs

Para evaluar el rango de respuesta lineal del sistema GC-MS/MS se prepararon patrones con concentraciones comprendidas entre 2 y 1500 ng/mL, inyectándolos por triplicado. La representación de las áreas de pico frente a concentración proporcionó rectas con coeficientes de determinación (R^2) comprendidos entre 0.996 y 0.999. La repetibilidad de inyección se evaluó

mediante inyecciones consecutivas de un patrón de 5 ng/mL. Los coeficientes de variación para todos los compuestos fueron inferiores al 9 %. Por último, los límites de cuantificación del equipo fueron estimados con la inyección de patrones de concentraciones en un rango de 0.5 y 5 ng/mL, obteniendo valores inferiores a 1 ng/mL para la mayoría de los compuestos. En la tabla I.12 se resumen estos resultados.

Tabla I.12. Características del sistema de medida (GC-MS/MS) para patrones sellados en acetonitrilo. Columna HP5-MS.

	MeP	EtP	PrP	BuP	TCS
Linealidad (R^2)	0.999	0.998	0.996	0.996	0.999
Repetibilidad (% RSD, n=6)	7.5	3.9	8.5	2.1	6.3
LOQ (ng/mL) ^a	0.5	1.3	0.3	0.3	0.7

^aHP5-MS

En conjunto, estos datos son equivalentes a los presentados en la tabla I.7 para los mismos compuestos, empleando también GC-MS/MS como técnica de determinación, a pesar de que se utilizaron dos columnas y dos sistemas de GC-MS/MS físicamente diferentes, el disolvente y las condiciones de derivatización fueron distintos.

1.4.3.2. Exactitud, precisión y límites de cuantificación del método

La precisión del método analítico se evaluó considerando las desviaciones estándar relativas correspondientes a la extracción de una muestra de polvo en un mismo día (repetibilidad) y en días consecutivos (reproducibilidad). Los resultados obtenidos mostraron coeficientes de variación, en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad, inferiores al 13 %.

Los límites de cuantificación del método fueron estimados considerando el factor de concentración obtenido (0.5 g de muestra, 1 mL de extracto final) y los LOQs del sistema GC-MS/MS. Los valores obtenidos oscilaron entre 0.6 y 2.6 ng/g (tabla I.13). De nuevo no se observaron problemas de contaminación en los blancos del proceso.

Para el estudio de exactitud se llevaron a cabo dos series de experimentos. En la primera, se utilizaron muestras discretas de polvo, con bajos contenidos de los analitos, fortificadas con una concentración conocida de los compuestos estudiados. Las recuperaciones fueron calculadas

dividiendo la diferencia de concentraciones para muestras con y sin adición, entre el valor añadido. Los resultados obtenidos, expresados como porcentaje, oscilan entre 84 % para el BuP y 114 % para el MeP. Los coeficientes de variación asociados fueron inferiores al 10 %, tabla I.13.

Tabla I.13. Repetibilidad, reproducibilidad, LOQs y recuperaciones para la metodología desarrollada.

Analito	Repetibilidad (% RSD, n=4) ^a	Reproducibilidad (% RSD, n=12) ^a	LOQ (ng/g)	Recuperación ± SD	
				50 ng/g PBs 300 ng/g TCS	300 ng/g PBs 700 ng/g TCS
MeP	4.7	8.6	1.3	114±9	102±3
EtP	4.5	4.4	2.6	87±10	90±5
PrP	3.4	2.8	0.6	93±7	98±5
BuP	5.3	4.4	0.7	84±4	84±4
TCS	6.0	13.0	1.5	108±6	102±5

^aPara estos estudios la muestra de polvo fue fortificada con EtP y BuP a nivel de 300 ng/g

En la segunda serie de experimentos, se compararon los resultados obtenidos para la extracción de fracciones de una misma muestra de polvo, sin adición de los compuestos, con MSPD frente a Soxhlet, como método de referencia, y la metodología de PLE desarrollada en la primera parte de este capítulo. La extracción Soxhlet se realizó con 75 mL de acetonitrilo durante 12 horas. Los resultados obtenidos para PLE y Soxhlet, expresados como recuperaciones frente a la concentración obtenida usando MSPD, se presentan en la tabla I.14. MSPD proporcionó valores análogos a PLE y Soxhlet, siendo la primera técnica más sencilla y menos costosa, además de requerir un menor consumo de disolventes.

Tabla I.14. Recuperaciones relativas (%) proporcionadas por Soxhlet y PLE frente al método de MSPD desarrollado.

	MeP	EtP	PrP	BuP	TCS
Soxhlet	99±4	111±6	89±11	100±4	113±16
PLE	124±3	116±1	103±4	104±2	95±12

1.5. Análisis de muestras reales

Empleando las dos metodologías desarrolladas en este capítulo se analizaron varias muestras de polvo procedentes de edificios públicos (2, 3 y 11) y viviendas particulares (restantes). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla I.15, junto con el contenido de carbono orgánico (TOC) de algunas de ellas.

Tabla I.15. Niveles de parabenos y triclosán en muestras de polvo (fracción inferior a 60 µm) procedentes de viviendas particulares y edificios públicos (N=3).

Código	TOC (%)	Extracción	Concentración ± SD (ng/g)				
			MeP	EtP	PrP	BuP	TCS
1	18	PLE	409±41	43±2	216±14	34±2	251±50
2	14	PLE	112±10	17±3	36±5	16±1	25±8
3	19	PLE	242±12	553±6	210±8	43±4	1228±223
4	27	PLE	493±30	108±3	176±5	134±1	2444±426
5	33	PLE	1335±5	346±16	836±75	213±28	660±25
6	30	PLE	1640±22	304±13	834±9	245±6	1100±31
7	20	PLE	138±17	12±2	12±1	nd	569±18
8	23	PLE	878±12	525±19	724±28	178±16	1724±241
9	34	PLE	1092±127	162±9	762±75	74±10	1253±107
10	22	PLE	328±26	46 ± 3	235±20	106±3	90 ± 3
11	18	MSPD	190±41	22±5	220±31	29±4	299±13
12	-	MSPD	442±89	67±13	396±75	51±8	284±45
13	20	MSPD	68±21	5±1	4±1	1±1	601±1
14	23	MSPD	783±78	370±12	529±26	188±11	2179±175
15	24	MSPD	608±58	84±6	466±22	99±1	853±36
16	25	MSPD	470±8	23±2	429±15	35±1	465±23
17	-	MSPD	577±17	123±6	540±38	211±11	957±74
18	-	MSPD	89±10	287±32	162±20	28±6	239±9
19	-	MSPD	194±28	48±4	248±27	15±3	584±68
20	-	MSPD	973±22	56±8	1052±34	101±3	444±9
		Máximo	1640	553	1052	245	2444
		Mínimo	68	5	4	1	25
		Media	553	160	404	95	812

nd: por debajo LOQ

En todas las muestras analizadas, aparecen los parabenes y el triclosán con excepción de la muestra número 7, en la cual no se ha podido cuantificar el BuP. Los niveles promedio de los compuestos en las muestras de polvo decrecen en el orden TCS>MeP>PrP>EtP>BuP, de modo que su concentración, al menos en el caso de los parabenes, guarda cierta relación con los porcentajes relativos de estos compuestos en los productos de cuidado personal. Las muestras 2, 3 y 11 corresponden a edificios públicos. Las concentraciones de los compuestos estudiados en estas muestras son inferiores que los existentes en viviendas particulares. La presencia de TCS y parabenes en polvo puede estar asociada a derrames de productos cosméticos que los contienen en su formulación, células epiteliales y, en el caso del triclosán, difusión desde textiles y otras superficies tratadas con este bactericida. En algunas muestras, el TCS que se encuentra a niveles próximos a los medidos en los lodos (tabla I.12, capítulo IV) y podría justificar la presencia de este compuesto en fluidos biológicos de humanos que han declarado no usar PPCPs conteniendo TCS [Allmyr M; 2006].



CAPÍTULO VI

I. DETERMINACIÓN DE TRICLOSÁN Y METILTRICLOSÁN EN MUESTRAS DE MATERIAL BIOLÓGICO

1.1. Introducción

1.1.1. Antecedentes bibliográficos

El uso continuo de triclosán (TCS) en productos de cuidado personal y otros materiales de uso cotidiano provoca su descarga en el medio acuático. Las aguas residuales así como los lodos de depuradora, tal como hemos visto en los capítulos III y IV, son los principales vectores de introducción de este compuesto en el medio ambiente. El triclosán, una vez ha alcanzado el medio acuático, puede ser transformado por los organismos dando lugar al producto de biometilación del mismo, el metiltriclosán (MTCS) [Balmer ME; 2004], el cual a diferencia del TCS no es susceptible de eliminarse a través de procesos de fotodegradación [Aranami K; 2007][Mezcua M; 2004][Lindstrom A; 2002].

Tanto TCS como MTCS presentan una elevada lipofilidad ($\log K_{ow}$ 4.8 y 5.4 respectivamente) lo que hace posible su acumulación en matrices de naturaleza orgánica. De hecho, la concentración de ambos compuestos en los sólidos (lodos y sedimentos) es muy superior que en el agua [Bester K; 2003]. En algas, se han detectado factores de bioacumulación de hasta 1000 veces [Coogan MA; 2007]. También se han encontrado ambos compuestos en músculo [Balmer ME; 2004 y 2005], bilis [Adolfsson-Erici M; 2002][Houtman CJ; 2004] y plasma de pescado [Valters K; 2005][Alaee M; 2003], de modo que el riesgo de entrada de ambas especies en la cadena trófica es considerable. La rapidez con la que se produce la bioacumulación de TCS y MTCS se ha puesto de manifiesto en experimentos con caracoles de agua dulce, expuestos durante dos semanas a agua de un lago con concentraciones medias de TCS y MTCS de 100 ng/L y 41 ng/L, respectivamente. La concentración de TCS en estos organismos aumentó diez veces, mientras que el factor de bioacumulación fue de 50 veces para el MTCS [Coogan MA; 2008].

Por otro lado, la incorporación del TCS como agente bactericida en polímeros y productos de cuidado personal (por ejemplo, pasta de dientes, jabones,...) se ha convertido en una de los principales vías de exposición humana a este compuesto. La formulación conocida como Microban® es añadida a diferentes superficies tales como tableros de corte, films protectores, utensilios y encimeras de cocina e incluso suelos en industrias dedicadas al procesado de alimentos [http://www.silestone.com][http://www.microban.com], para proporcionarle propiedades antibacterianas. Dado que los alimentos están en contacto con estas superficies, es factible que se produzca la migración del aditivo (TCS) a los alimentos, principalmente a aquellos con altos contenidos en materia grasa [Moretro T; 2006][Sánchez-Silva A; 2005][Chung D; 2003].

En este capítulo de la Tesis Doctoral se describe la optimización un procedimiento para la extracción de TCS y MTCS en pescado y en alimentos grasos, aplicable a su determinación en peces, y válida también para estudiar la posible migración del TCS desde las superficies tratadas con este bactericida a los alimentos en contacto con las mismas.

Con respecto a las metodologías descritas en la bibliografía para el análisis de TCS en muestras biológicas, todas ellas presentan una elevada complejidad debido a la dificultad inherente de la matriz. La presencia de macromoléculas y grasas en las muestras hace necesario aplicar técnicas de purificación, que no siempre están al alcance de todos los laboratorios o que simplemente son poco sostenibles. De nuevo, la cromatografía de permeación en gel (GPC) ha sido utilizada por diferentes autores para purificar extractos con contenidos en grasas relativamente elevados [Valters K; 2005][Balmer ME; 2004]. Otras técnicas menos complejas, se basan en la mineralización (oxidación) de las grasas con ácido sulfúrico adicionado directamente al extracto [Adolfsson-Erici M; 2002], o impregnado sobre partículas de sílica [Valters K; 2005]. En ninguna de estas aplicaciones, la etapa de *clean-up* se han integrado en el proceso de extracción dando lugar a métodos complejos, largos y por tanto, propensos a errores, tabla I.1.

Tabla I.1. Metodologías de preparación de muestra para la determinación de triclosán y metiltriclosán en matrices biológicas y alimentos.

Análitos y matriz	Procedimiento	Detección	LOD (ng/g)	RSD (%)	Rec. (%)	Ref.
MTCS y filtros solares en grasa de pescado	LLE de 10-25 g de grasa con 100 mL de agua ultrapura, 2 mL de oxalato potásico al 35 %, 100 mL etanol, 50 mL dietiléter y 70 mL de pentano. Recoger FO y realizar GPC (Biobeads S-X8), eluir con ciclohexano:AcOEt 1:1, a 5 mL/min. Evaporar a 1 mL, limpieza con 5 g de sílica.	GC-MS	2	--	--	(1)
MTCS y filtros solares en músculo de pescado	Mezclar 20 g de músculo de pescado con Na ₂ SO ₄ . Extraer con DCM:Hexano (1:1). Purificar usando GPC (Biobeads S-X3), eluir con DCM:ciclohexano (35:65), a 3 mL/min. Evaporar a 1 mL, limpieza con 5 g de sílica.	GC-MS	3	--	--	(2)
PBDEs y derivados, TCS y MTCS en plasma de pescado	Desnaturalizar 4 g de plasma con 1 mL HCl 6 M y 3 mL isopropanol. LLE 3 x 3 mL de MTBE:Hexano (1:1). Recoger FO y añadir NaOH 50 % en MeOH. Separación de FA (TCS y OH-BDEs) y FO (BDEs, MeO-BDE y MTCS). Acidificar FA y re-extraer a medio orgánico. Secar con Na ₂ SO ₄ y derivatizar con diazometano y purificar con 8 g de Florisil. La FO se purifica con 5 g de sílica conteniendo 22 % de H ₂ SO ₄ , eluyendo 50 mL de DCM:Hexano (1:1). Concentrar ambas fracciones a 0.1 mL.	GC-MS	--	--	>85	(3)

Analitos y matriz	Procedimiento	Detección	LOD (ng/g)	RSD (%)	Rec. (%)	Ref.
MTCS en músculo de pescado	Mezclar 25 g de muestra con 100 g de Na ₂ SO ₄ y 150 mL de DCM:hexano (1:1). Añadir ¹³ C ₁₂ -PCB-77 como surrogado. Trasvasar a columna de vidrio, eluir con 200 mL de mezcla. Concentrar para determinar residuo lipídico y realizar GPC (Phenomenex EnviroSep-ABC Guard). Eluir los analitos con DCM:Hexano (35:65) a 3 mL/min.	GC-MS	3	--	76-108	(4)
MTCS en músculo de pescado	PLE de 5 g de muestra mezclado con 10 g de hidromatrix. Ciclohexano:DCM (1:1) a T ^o Amb. y 1500 psi en 3 ciclos de 9 min. Adición de ¹³ C ₁₂ -PCB-77 y GPC (Phenomenex EnviroSep-ABC Guard) utilizando DCM:Hexano (35:65) a 3 mL/min. Purificar los extractos con 0.8 g de sílica (5 % de agua).	GC-MS	3	--	76-108	(4)
TCS y MTCS en plasma de pescado	Desnaturalizar 4 g de plasma con 1 mL HCl 6 N y 3 mL isopropanol. LLE con 3 X 3 mL de MTBE:Hexano (1:1). Recoger FO y purificar con Florisil. La FA se basifica con KOH 1M en MeOH 50 % y se extrae con MTBE:Hexano (1:1) tras la acidificación. Recoger FO, secar con Na ₂ SO ₄ y derivatizar con diazometano. Purificar con sílica-H ₂ SO ₄ 22 %.	GC-MS GC-ECD	--	--	--	(5)
TCS y otros contaminantes estrogénicos en bilis de pescado	Tratar 1 g de bilis con β-glucuronidasa y sulfatasa. Realizar la LLE con 2 X 2 mL de DCM. Purificar por GPC.	GC-MS	--	--	--	(6)
TCS en bilis de pescado	Hidrolizar 0.2 g de bilis con 20 μL de β-glucuronidasa en 1 mL de tampón acético a pH 5. Incubar 2 horas y añadir 2 mL de agua y realizar LLE con 2 X 3 mL de Hexano:MTBE (2:1). Evaporar las FO a sequedad y reconstituir con AcOEt.	GC-MS	--	--	--	(7)
TCS en leche materna	LLE de 10 mL de leche con 10 mL de ácido fórmico y 2 X 2 mL de hexano. Concentrar a sequedad la FO. Reconstituir con 2 mL de hexano y realizar LLE con 2 mL de KOH 0.5 M en 50 % EtOH y 2 X 3 mL de hexano. Añadir 1 mL de HCl 1 M y LLE con 2 X 3 mL de Hexano:MTBE (9:1). Evaporar la FO a sequedad, redissolver en 2 mL hexano y añadir H ₂ SO ₄ . Evaporar la FO y derivatizar con anhídrido acético.	GC-MS	--	--	--	(7)
TCS, MTCS y TCC en algas	Mezclar 2 g de algas con 35 g de Na ₂ SO ₄ , añadir patrones internos marcados isotópicamente, y realizar extracción Soxhlet durante 6 horas con 100 mL de DCM. Evaporar a 5 mL y eliminar lípidos mediante GPC, concentrando a 0.1-1 mL.	LC-MS y GC-MS	5-10	11.2	80-107	(8)

Analitos y matriz	Procedimiento	Detección	LOD (ng/g)	RSD (%)	Rec. (%)	Ref.
TCS en plasma y leche humana	Hidrolizar 3-5 g de muestra, conteniendo ¹³ C ₁₂ -TCS como surrogado, con H ₂ SO ₄ 9M a 60°C durante 30 min. Enfriar y LLE con 6 y 4 mL de hexano:acetona (9:1). Añadir 2 mL KOH 0.5 M en EtOH 50 %. Acidificar FA con 1 mL HCl 2 M, y extraer con 4 y 2 mL de hexano:acetona (9:1). Tratar la FO con 4 mL de H ₂ SO ₄ 13.7 M y reextraer con 2 mL de hexano:acetona (9:1). Combinar las fases orgánicas, concentrar y convertir en derivados pentafluorbencilados.	GC-ECD GC- NCI/MS	0.009- 0.018	--	95	(9)(10)
TCS en alimentos varios	Zumo de naranja: LLE de 10 g con 3 x 10 mL de hexano, agitar 10 minutos. Combinar FO y concentrar a sequedad. Redisolver en 10 mL de ACN 90 %. Pollo: Mezclar 10 g + 10 mL hexano + 2 mL ACN, agitar 10 minutos. LLE con 2 X 10 mL hexano. Combinar y concentrar a sequedad. Reconstituir con ACN 90 %. Queso: LLE de 10 g con 3 X 10 mL de hexano durante 10 minutos. Concentrar FO a sequedad y añadir al residuo graso 2 x 10 mL de ACN. Evaporar el ACN y reconstituir con 10 mL de ACN 90 %.	LC-UV LC-MS	25	--	83- 112	(11)
TCS, clorofenoles y otros en orina	Hidrolizar con enzimas 0.1 mL de orina en un medio tamponado en acetato amónico, incubando toda la noche a 37°C. Diluir con 0.8 mL de ácido fórmico y centrifugar. Realizar la SPE con cartuchos de C18, eluyendo con MeOH:H ₂ O (1:1).	LC-MS/MS	6	--	--	(12)

(1) Buser HR, 2006; (2) Balmer ME, 2005; (3) Valters K, 2005; (4) Balmer ME, 2004; (5) Alaei M, 2003; (6) Houtman CJ, 2004; (7) Adolfsson-Erici M, 2002; (8) Coogan MA, 2007; (9) Allmyr M, 2006 A; (10) Allmyr M, 2006 B ; (11) Sanches-Silva A, 2005; (12) Ye X, 2005.

En nuestro trabajo se eligió la dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) como técnica de extracción, incorporando en la parte inferior de los cartuchos diferentes adsorbentes con objeto de purificar los extractos primarios. De este modo, se integró la extracción y la etapa de *clean-up* en el mismo paso, siguiendo una estrategia similar a la aplicada a muestras de polvo. Los objetivos básicos del método desarrollado fueron: maximizar los niveles de TCS y MTCS en los extractos y minimizar el residuo lipídico de los mismos.

1.1.2. Determinación de contenido graso de las muestras. Método Bligh & Dyer

La determinación del contenido graso de las muestras consideradas en este estudio: músculo de salmón (*Salmo salar*) y de trucha (*Oncorhynchus mykiss*), fiambres y quesos, se ha realizado con el denominado método de Bligh & Dyer [Jensen S; 2003][Smedes F; 1996]. En un embudo de decantación, se introdujeron 2.5 g de muestra junto con 10 mL de metanol y 5 mL de cloroformo. Después de agitar el embudo durante varios minutos, se añadieron otros 5 mL de

cloroformo y se volvió a agitar otros 2 minutos. Pasado este tiempo, se añadieron 10 mL de agua ultrapura agitando de nuevo la mezcla. Tras la separación de ambas fases, se recogió la fase orgánica situada en la parte inferior del embudo. La fase acuosa se volvió a extraer con una mezcla de metanol:cloroformo (1:9), recogiendo nuevamente la fase orgánica y mezclándola con la anterior. El extracto orgánico combinado se concentró a un volumen de, aproximadamente, 0.5 mL y se trasvasó a un vial previamente pesado, concentrándolo a sequedad hasta peso constante. La variación en la masa del vial corresponde al contenido en grasa de la muestra. Los porcentajes de grasa correspondientes a trucha y salmón frescos y liofilizados se muestran en la tabla I.2.

Tabla I.2. Contenido graso de las muestras de pescado utilizadas para optimizar la metodología de extracción de triclosán y metiltriclosán.

Salmón fresco	Trucha fresca	Salmón liofilizado	Trucha liofilizada
17.9 %	6.2 %	58.8 %	31.0 %

1.1.3. Condiciones instrumentales de medida

La determinación de TCS y MTCS en matrices biológicas exige una alta sensibilidad y selectividad en la etapa de medida. De nuevo, se seleccionó la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas en tándem como técnica de detección y cuantificación de los compuestos. Las condiciones instrumentales de medida se resumen en la tabla I.3.

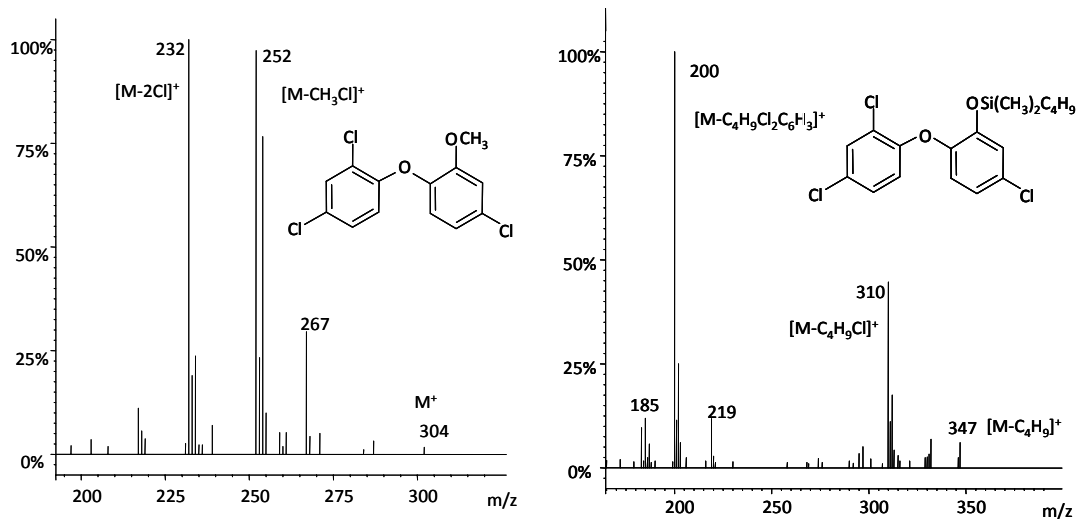
Tabla I.3. Condiciones de GC-MS/MS para la determinación de triclosán y metiltriclosán en los extractos de muestras biológicas y alimentarias.

Compuesto	Tr (min) ¹	Ión precursor (m/z)	Iones producto (m/z)	Amplitud de excitación (V)	Nivel de almacenamiento (m/z)
MTCS	21.18	304	232, 252, 254	1.50	130
TCS	23.29	347	200, 310	1.50	140

¹HP5-MS

Los espectros de MS/MS, correspondientes a TCS y MTCS, se muestran en la figura I.1. La fragmentación del triclosán, tal como se ha descrito en el capítulo IV, consiste en la pérdida de un átomo de Cl y la ruptura del enlace éter. Para el metiltriclosán se observa la pérdida de CH₃Cl y 2 átomos de Cl, dando lugar a los fragmentos 252+254 y 232+234 con la relación isotópica correspondiente a especies conteniendo 1 y 2 átomos de cloro.

Figura I.1. Espectros de MS/MS para el MTCS y el TCS.



1.2. MSPD con retención de lípidos

Las muestras de pescado liofilizado tienen un alto contenido de grasa, especialmente el salmón, que puede interferir en la determinación de los analitos, usando columnas capilares para cromatografía de gases. En los estudios preliminares, se evaluó el porcentaje de grasa (como peso del residuo después de evaporar a sequedad) existente en los extractos de muestras de salmón liofilizado. La técnica de preparación de muestra usada fue la MSPD considerando acetonitrilo y acetato de etilo como disolventes de elución. Los materiales evaluados como dispersante y co-adsorbentes fueron C18 (70-230 mesh), Florisil (60-100 mesh), alúmina (150 mesh) y sílica (230-400 mesh), secados los tres últimos a 130°C durante 24 horas. Medio gramo de muestra fue mezclado con 1 g de sulfato sódico anhidro para eliminar posibles restos de agua que pudiesen quedar en la matriz. A continuación, se dispersó con 2 g del adsorbente seleccionado, en un mortero de vidrio, hasta obtener un polvo fino y uniforme. En el cuerpo de polipropileno de la jeringa de MSPD, se depositaron 2 g del co-adsorbente y, a continuación, la muestra dispersada. Se eluyeron 15 mL de acetonitrilo o acetato de etilo. La tabla I.4 muestra los resultados obtenidos expresados como cociente entre el peso del residuo seco (obtenido al evaporar los extractos a sequedad) y la masa de muestra (0.5 g), multiplicado por 100.

Tabla I.4. Porcentaje de lípidos en los extractos de salmón (0.5 g de muestra liofilizada) considerando distintas combinaciones de adsorbentes y disolventes de elución en el proceso de MSPD.

Dispersante (2 g)	Co-adsorbente (2 g)	Eluyente	
		Acetonitrilo	Acetato de etilo
C18	C18	0.96 %	--
C18	Florisil	2.80 %	37.60 %
C18	Alúmina	2.90 %	34.29 %
C18	Sílica	3.05 %	32.30 %
Florisil	C18	0.29 %	35.10 %
Alúmina	C18	0.42 %	32.90 %
Sílica	C18	0.97 %	44.11 %

Como se observa en la tabla anterior, la utilización de acetato de etilo condujo a extractos con contenidos en grasa mucho más elevados que el acetonitrilo. Para este disolvente, la combinación de un adsorbente en fase normal como agente dispersante y C18 como co-adsorbente proporcionó mejores resultados frente a la situación inversa. Este comportamiento ya había sido descrito por Pensado y colaboradores [Pensado L; 2005] en la determinación de PAHs en músculo de salmón y rodaballo. De todos modos, en la mejor de las situaciones (Florisil como dispersante y C18 como co-adsorbente), la cantidad de grasa en extracto (equivalente a 1.5 mg) sigue siendo un valor

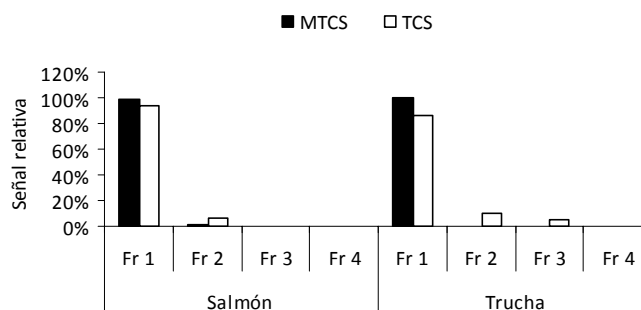
elevado que puede mermar en gran medida la vida útil de la columna, así como crear problemas en el análisis cromatográfico. En experimentos posteriores con salmón liofilizado, se aumentó la masa de C18 usado como co-adsorbente para intentar reducir los niveles de lípidos en los extractos. También se utilizaron co-adsorbentes de limpieza mixtos, es decir, combinaciones de C18 con Florisil. Los resultados obtenidos, se muestran en la siguiente tabla (tabla I.5).

Tabla I.5. Residuo graso en los extractos de salmón liofilizado usando Florisil como agente dispersante y C18 ó C18-Florisil como co-adsorbente en distintas cantidades.

Dispersante	Co-adsorbente	% residuo
Florisil (2 g)	C18 (3 g)	0.37
Florisil (2 g)	C18 (1 g) + Florisil (2 g)	0.37
Florisil (2 g)	C18 (2 g) + Florisil (2 g)	0.32

Dado que el porcentaje de grasa en el extracto se mantuvo prácticamente invariable, se continuó trabajando con 2 g de Florisil como dispersante y la misma masa de C18 como co-adsorbente. En estas condiciones, se evaluó el volumen de acetonitrilo necesario para eluir los analitos de los cartuchos de MSPD. Para ello, se utilizaron dos tipos de muestra con distinto contenido graso: salmón y trucha. En ambos casos, 0.5 g de muestra fueron dispersados con 1 g de sulfato sódico anhidro y 2 g de Florisil en un mortero para, a continuación, transferirlos a cartuchos de MSPD conteniendo como co-adsorbente 2 g de C18. De cada cartucho se recogieron fracciones consecutivas de 5 mL, concentrándolas a 2 mL y derivatizando una alícuota de 0.5 mL con 100 µL de MTBSTFA en las condiciones descritas para las muestras de polvo. Los resultados obtenidos se muestran en la figura I.2.

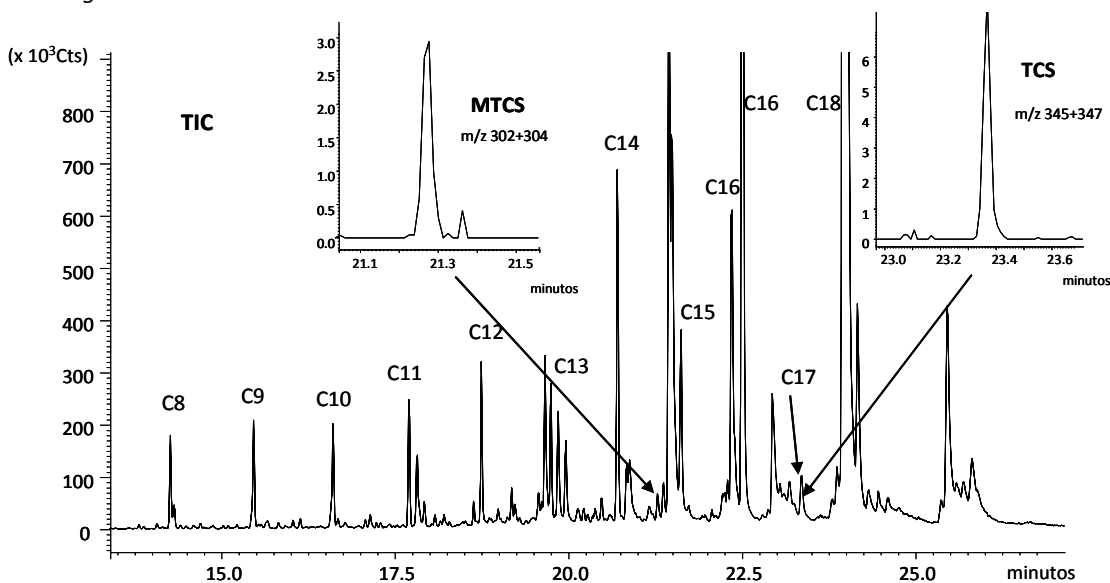
Figura I.2. Extracción con acetonitrilo (fracciones de 5 mL) de TCS y MTCS en muestras de trucha y salmón liofilizado.



Como se puede apreciar en la figura anterior, el metiltriclosán se recuperó con 5 mL de disolvente, mientras que la distribución del triclosán en las fracciones sucesivas de acetonitrilo dependió de la matriz considerada, seleccionando finalmente 15 mL de este disolvente. En estas condiciones, se evaluó la recuperación obtenida para una muestra de salmón con adición de los analitos a nivel de 300 ng/g. El extracto, una vez concentrado a 5 mL, fue derivatizado con 100 μ L de MTBSTFA previamente a su inyección en GC-MS. Las recuperaciones obtenidas, para $n=3$, fueron de $97.0\pm 11\%$ y $99.1\pm 13\%$ para MTCS y TCS, respectivamente.

La figura 1.3 muestra el cromatograma de GC-MS (TIC) correspondiente a uno de los extractos. Los picos más intensos que aparecen en el mismo fueron identificados por comparación con la librería NIST, como derivados tert-butildimetilsililados de ácidos grasos saturados e insaturados.

Figura 1.3. Cromatograma de GC-MS (TIC) para una muestra de salmón con adición de TCS y MTCS a nivel de 300 ng/g. Los picos nombrados como C8 a C18 corresponden a los derivados sililados de ácidos grasos con el número de carbonos indicado.



Debido a la presencia de niveles significativos de ácidos grasos en los extractos, se planteó la posibilidad de llevar a cabo una etapa de purificación *off-line* de los mismos con cartuchos comerciales (500 mg) de diferentes adsorbentes en fase normal (Florisil, sílica, alúmina), así como de aminas primarias-secundarias (PSA), material recomendado para la eliminación de ácidos grasos en extractos de aceites y aceitunas [García-Reyes JF; 2007]. Para llevar a cabo este estudio se preparó

un *pool* de extractos de muestras de salmón. Alícuotas de 0.5 mL se depositaron en cartuchos comerciales, conteniendo 0.5 g de los adsorbentes anteriores, eluyendo 5 mL de acetonitrilo, que posteriormente fueron concentrados a sequedad para determinar el residuo graso. Los resultados obtenidos mostraron que la limpieza *off-line*, no proporcionó una mejora sustancial en el contenido en lípidos de los extractos finales ya que, en el caso de muestras de salmón liofilizado, estos todavía contienen del orden de 0.8 mg de lípidos, tabla I.6.

Tabla I.6. Porcentaje de lípidos eliminados en la etapa adicional de limpieza off-line.

	Sílica	Florisol	Alúmina	PSA
<i>% eliminación</i>	54.9	60.7	41.2	38.9

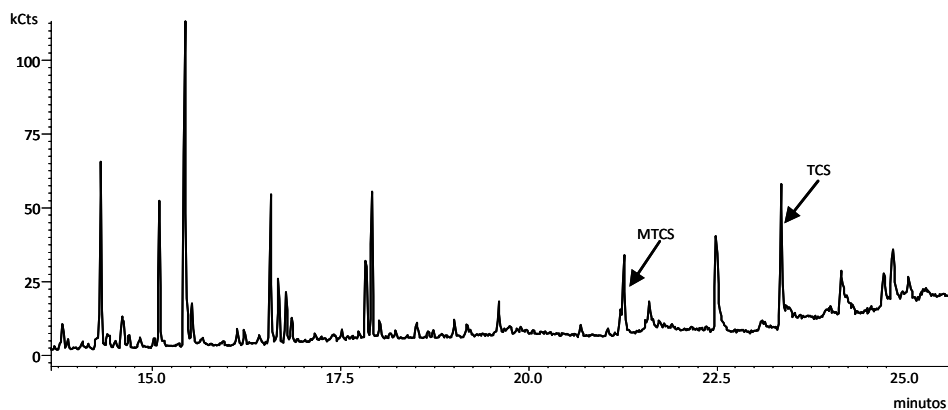
1.3. MSPD con eliminación de lípidos

Una alternativa a las estrategias de purificación descritas anteriormente es el uso de materiales en fase normal impregnados con un ácido. En concreto, la utilización de sílica impregnada con un 44 % de ácido sulfúrico, ha permitido obtener extractos completamente libres de lípidos en la determinación de PCBs y PBDEs en muestras biológicas [Carro AM; 2005][Martínez A; 2005]. Los mayores problemas derivados del empleo de este tipo de co-adsorbentes son la destrucción de los analitos o la retención de los mismos en la capa de carbón que se genera al oxidar los ácidos grasos [Pensado L; 2005][Wells DE; 1994]. En el caso del triclosán y el metiltriclosán sólo se ha encontrado una referencia en la cual se utiliza la sílica impregnada con ácido sulfúrico, al 22 % (p/p), para purificar los extractos obtenidos mediante la extracción líquido-líquido de plasma de pescado [Alaee M; 2003].

En una primera aproximación a la optimización de esta segunda estrategia, se realizó una MSPD de una muestra de salmón liofilizado en las siguientes condiciones: 0.5 g de muestra se homogeneizaron con 2 g de sulfato sódico anhidro y 1.5 g de sílica (activada a 130°C durante 24 horas) en un mortero de vidrio. En el cartucho de MSPD se depositaron previamente 3 g de sílica impregnada con un 10 % (p/p) de H₂SO₄. Ésta se preparó mezclando sílica activada (130°C durante 24 horas) con el correspondiente volumen de ácido sulfúrico concentrado. Una vez homogeneizada, se introdujo de nuevo en una estufa a 110°C durante 12 horas, almacenándola posteriormente en un desecador.

El cartucho de MSPD fue eluido con 15 mL de diclorometano, concentrándolo posteriormente a sequedad. El residuo fue aproximadamente 5-6 veces inferior al obtenido con la metodología descrita en el apartado anterior (0.05-0.06 % de la masa de la muestra). Por otra parte, se confirmó que el triclosán y el metiltriclosán son capaces de resistir el proceso oxidativo, obteniendo señales del mismo orden de magnitud que las correspondientes al patrón de adición utilizado para fortificar la muestra. El cromatograma de GC-MS, para una muestra de salmón (figura I.4), mostró una complejidad inferior al presentado en la figura I.3, en donde los ácidos grasos eran co-extraídos junto con nuestros analitos. En base a estos resultados, se procedió a la optimización de las condiciones de extracción usando MSPD con oxidación química del residuo graso sobre sílica ácida.

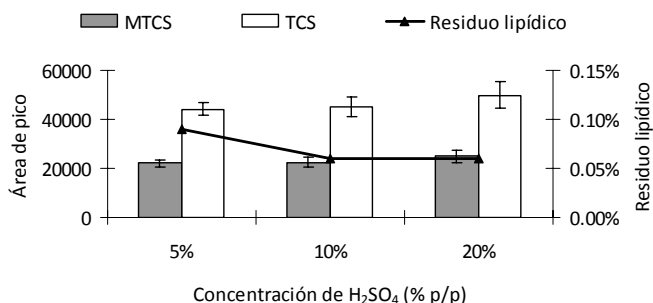
Figura I.4. Cromatograma de GC-MS (TIC) para un extracto en diclorometano utilizando como co-adsorbente sílica ácida (10 % de H_2SO_4 p/p). Salmón liofilizado conteniendo 300 ng/g de TCS y MTCS.



1.3.1. Porcentaje de ácido sulfúrico en el co-adsorbente

El primer parámetro optimizado fue la concentración de ácido sulfúrico (5, 10, 20 % p/p) necesaria para oxidar por completo los lípidos presentes en la matriz, sin afectar a la estabilidad de los compuestos estudiados. Para la realización de este estudio, muestras de 0.5 g de salmón liofilizado, con adición de 300 ng/g de MTCS y TCS, fueron dispersadas en un mortero de vidrio con 2 g de sulfato sódico anhidro y 1.5 g de sílica activada. En la parte inferior del cartucho de MSPD se depositaron 3 g de sílica ácida con porcentajes variables de ácido sulfúrico. Dado que el diclorometano fue capaz de extraer el TCS y el MTCS, se utilizó como disolvente de elución, recogiendo volúmenes de 15 mL y concentrándolos posteriormente a 1 mL. Una alícuota de 0.5 mL se empleó para la determinación de residuo sólido, mientras que la otra porción fue evaporada a sequedad y reconstituida con 0.5 mL de acetato de etilo, para ser derivatizada e inyectada en el cromatógrafo de gases. La respuesta obtenida para ambos compuestos se mantuvo constante independientemente de la cantidad de ácido sulfúrico añadida a la sílica, figura I.5. Estos datos sugieren que los compuestos, además de ser estables en condiciones altamente oxidantes, no son retenidos en la capa de carbón que se forma debido a la oxidación de los lípidos, como se describió para los PAHs [Pensado L; 2005]. Con respecto al residuo lipídico presente en el extracto final, se apreció una ligera disminución cuando se aumentó la concentración de ácido de 5 % a 10 %, sin embargo, entre 10 % y 20 % los resultados fueron idénticos, por lo que se decidió emplear sílica impregnada con un 10 % de ácido sulfúrico en experimentos posteriores.

Figura I.5. Influencia de la concentración de ácido sulfúrico en las respuestas obtenidas para MTCS y TCS. Datos para salmón liofilizado (N=3 réplicas).



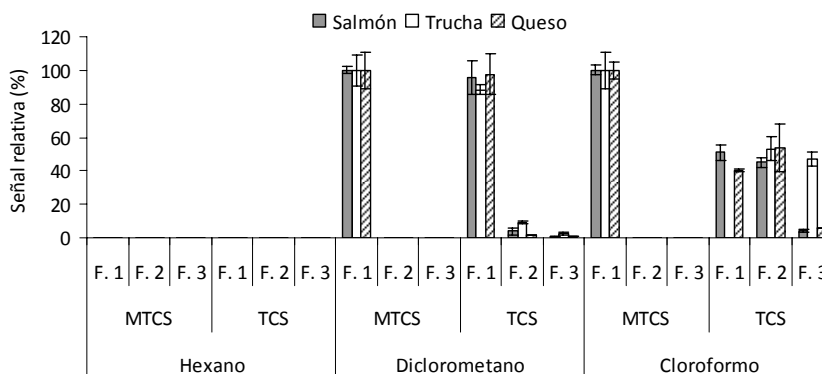
1.3.2. Tipo y volumen de extractante

Se evaluó la eficacia de extracción usando disolventes con polaridades crecientes: hexano, cloroformo y diclorometano. Disolventes de mayor polaridad, como el acetato de etilo, el metanol o acetonitrilo, no fueron considerados puesto que proporcionan extractos ácidos al romper las interacciones existentes entre la sílica y el ácido sulfúrico. El perfil de elución de TCS y MTCS para cada uno de los disolventes anteriores, fue estudiado con tres matrices que presentan distintos contenidos de materia grasa (m.g.): salmón liofilizado (59 % de m.g.), trucha liofilizada (31 % m.g.) y queso (40 % m.g.), todas ellos con adición de MTCS y TCS a nivel de 300 ng/g.

Para cada muestra y disolvente, se eluyeron fracciones consecutivas de 5 mL, las cuales fueron evaporadas a sequedad y reconstituidas posteriormente con 1 mL de acetato de etilo. Después de su derivatización, se inyectaron en GC-MS/MS, obteniendo los resultados mostrados en la figura I.6.

El hexano no fue capaz de extraer ni el TCS ni el MTCS del cartucho de MSPD, a diferencia del diclorometano y del cloroformo. Para las tres matrices consideradas, el MTCS fue recuperado con una única fracción de 5 mL de diclorometano o cloroformo. El comportamiento del TCS fue más complejo, puesto que su perfil de elución dependió claramente del tipo de disolvente y de la matriz. El cloroformo presentó menor poder extractante que el diclorometano, sobre todo para la muestra de trucha. Este comportamiento se explica en base a la diferencia de polaridades entre ambos compuestos (MTCS y TCS) y el coeficiente de partición octanol-agua de los disolventes utilizados. El analito más lipofílico (MTCS) se recuperó con 5 mL de ambos disolventes. El TCS, ligeramente más polar, presentó una mayor afinidad por el diclorometano ($\log K_{ow}$ 1.19) que por el cloroformo ($\log K_{ow}$ 1.76).

Figura I.6. Distribución de TCS y MTCS en fracciones consecutivas de diclorometano, cloroformo y hexano (5 mL cada una) para muestras de salmón, trucha y queso (N=3).



Finalmente, se seleccionaron 10 mL de diclorometano para la extracción conjunta del MTCS y del TCS de matrices biológicas.

1.3.3. Estabilidad de TCS y MTCS en las muestras con adición

Un aspecto importante a la hora de llevar a cabo el desarrollo de una metodología analítica es evaluar la estabilidad de los compuestos en la matriz, dado que la disminución en la respuesta analítica podría confundirse con posibles pérdidas en la etapa de limpieza en condiciones oxidativas. Además, es necesario asegurar que no tiene lugar la metilación parcial del TCS, durante el almacenamiento de las muestras.

Para investigar este aspecto, se fortificaron muestras de trucha liofilizada, a nivel de 300 ng/g, usando una disolución patrón de los analitos en acetona. Se dejó evaporar la acetona (12 horas en campana) y se evaluaron las recuperaciones obtenidas en función de las condiciones de almacenamiento descritas en la tabla I.7.

Como se puede comprobar en los resultados obtenidos, no hay diferencias significativas para los experimentos 1, 2 y 3, si bien es cierto que, la recuperación para el MTCS fue mayor que para el TCS. Para evaluar si es posible que se produzca biometilación del triclosán durante la etapa de almacenamiento, se repitieron los experimentos 2 y 3 fortificando las muestras sólo con TCS. Los resultados obtenidos, muestras 4 y 5, reflejaron que no hay conversión de TCS en MTCS, además las recuperaciones estuvieron próximas al 100 % en ambos experimentos.

Tabla I.7. Recuperaciones para muestras de trucha, fortificadas a nivel de 300 ng/g, en función de las condiciones de almacenamiento (N=3).

Experimento	Condiciones de almacenamiento (tiempo, temperatura)	% Recuperación ± SD	
		MTCS	TCS
1	No almacenada ^a	107.8±7.3	80.0±7.4
2	7 días, -20°C	94.8±8.6	92.1±12.9
3	7 días, 4°C	106.8±5.5	97.9±7.6
4	7 días, -20°C ^b	n.d.	101.1±3.3
5	7 días, 4°C ^b	n.d.	108.7±2.6

^aExtraída a las 12 horas de practicar la adición

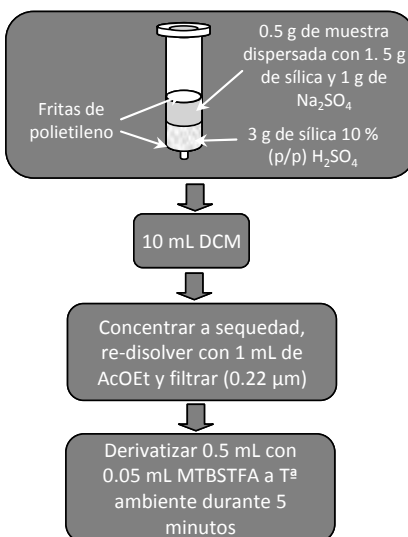
^bSólo se añadió triclosán

Por lo tanto, se puede concluir que no existen problemas de degradación, ni de interconversión entre TCS y MTCS, en muestras de pescado almacenadas a 4°C, durante 7 días.

1.4. Caracterización del método analítico

Una vez optimizadas las condiciones de extracción de las muestras de material biológico mediante MSPD con eliminación de lípidos, figura I.7, se procedió a la caracterización del método analítico propuesto.

Figura I.7. Esquema del proceso de extracción de TCS y MTCS en muestras de material biológico.



1.4.1. Caracterización del método de determinación (GC-MS/MS): linealidad, repetibilidad y LOQs

La linealidad en la respuesta del sistema GC-MS/MS fue evaluada inyectando patrones de triclosán y metiltriclosán preparados en acetato de etilo en concentraciones crecientes desde 2 ng/mL hasta 2 µg/mL. La respuesta se mantuvo lineal en el rango estudiado, obteniendo coeficientes de determinación de 0.998 y 0.999 para el MTCS y TCS respectivamente, con una repetibilidad de inyección inferior al 4 %. Los límites de cuantificación, estimados para una relación señal/ruido de 10, fueron de 0.5 ng/mL para el TCS y 1 ng/mL para el MTCS.

Tabla I.8. Linealidad, repetibilidad y LOQs de GC-MS/MS para patrones de MTCS y TCS.

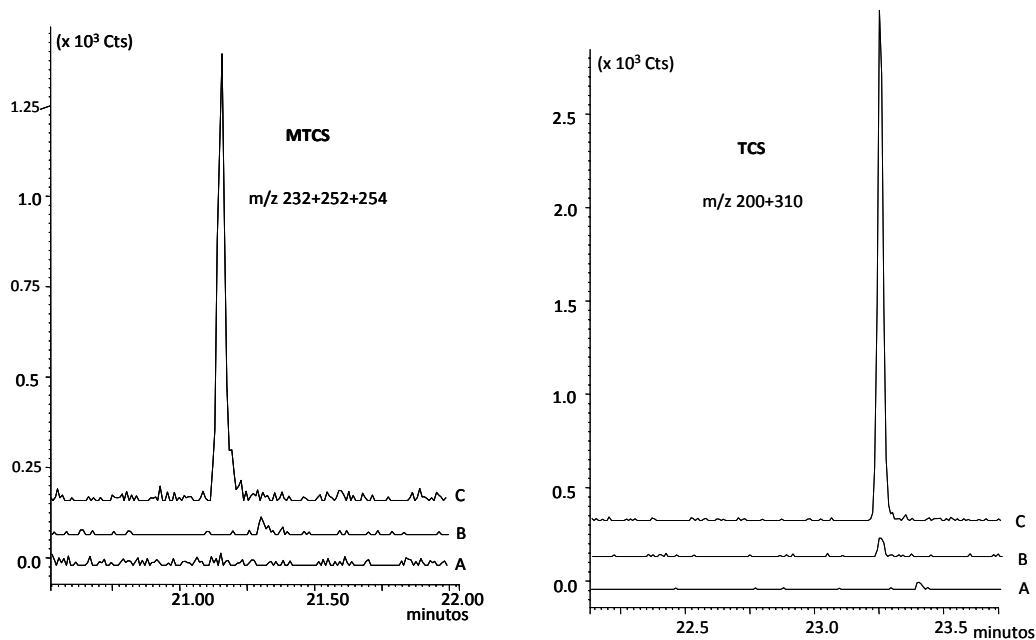
	Linealidad (R^2)	Rep. 25 ng/mL (% RSD, n=4)	LOQ (ng/mL)
MTCS	0.998	3.4	1
TCS	0.999	3.0	0.5

1.4.2. Exactitud, precisión y límites de cuantificación del método analítico

La eficacia de la metodología de extracción propuesta se evaluó usando muestras con distintos contenidos grasos. Las matrices empleadas fueron salmón (59 % m.g.) y trucha (31 % m.g.) liofilizados y dos alimentos frescos, queso en lonchas (40 % m.g.) y jamón cocido (3 % m. g.). Cada muestra fue dividida en tres porciones. Dos de ellas fueron enriquecidas con los analitos a dos concentraciones diferentes: 10 y 50 ng/g. La tercera se usó como blanco. Las muestras, con y sin adición, fueron almacenadas a 4°C durante una semana. Pasado este tiempo, fueron procesadas mediante la metodología desarrollada, al igual que los blancos de proceso. Los resultados obtenidos mostraron que ninguna de las muestras sin adición presentaba señal de los analitos, a excepción del jamón cocido. En la figura I.8 se observan los cromatogramas para la muestra de jamón con adición (10 ng/g), la muestra sin adición y un blanco de proceso. En todo caso, los niveles de MTCS y TCS en la muestra sin adición fueron inferiores a los LOQs del método.

Las recuperaciones obtenidas para las diferentes matrices estudiadas se presentan en la tabla I.9, junto con los respectivos coeficientes de variación del proceso analítico. Tal como se puede comprobar, las recuperaciones oscilaron entre 77 y 120 %, con unos coeficientes de variación inferiores al 12 %.

Figura I.8. Cromatogramas de GC-MS/MS para jamón cocido con adición de 10 ng/g de TCS y MTCS (C), muestra sin adición (B) y blanco de proceso (A).



La variabilidad inter-día se estudió con una muestra de salmón liofilizado con adición de 25 ng/g para ambos analitos, realizando las extracciones en 4 días consecutivos. Los resultados obtenidos mostraron reproducibilidades de 4.2 % y 7.2 % para MTCS y TCS, tabla I.9.

Los LOQs para la metodología desarrollada fueron de 1 y 2 ng/g para MTCS y TCS. Estos valores son del mismo orden que los estimados por Balmer y colaboradores utilizando masas de muestra de 5-25 g [Balmer ME; 2004].

Tabla I.9. Recuperaciones ($n=4$), reproducibilidad ($n=12$) y LOQs (ng/g) del método propuesto.

	% Recuperación \pm SD								Repr. (% RSD, $n=12$)	LOQ (ng/g)
	Salmón (59 % m.g.)		Trucha (31 % m.g.)		Queso (40 % m.g.)		Jamón (3 % m.g.)			
ng/g	10	50	10	50	10	50	10	50	25	
MTCS	120 \pm 3	109 \pm 8	111 \pm 12	95 \pm 11	103 \pm 12	110 \pm 7	85 \pm 9	92 \pm 8	4.2	2
TCS	112 \pm 9	98 \pm 7	107 \pm 9	79 \pm 4	95 \pm 9	113 \pm 9	77 \pm 11	85 \pm 6	7.2	1

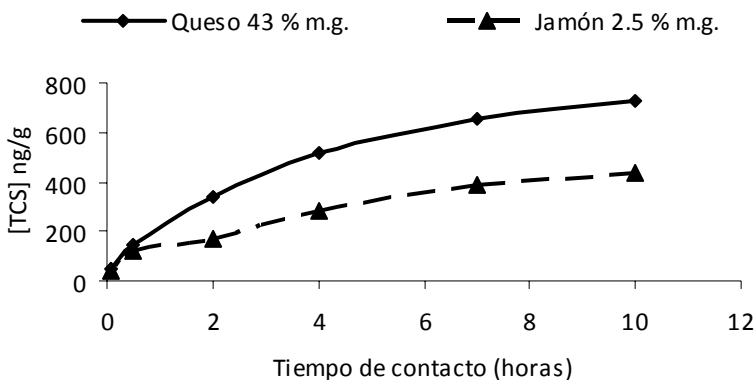
En comparación con otras metodologías existentes en la bibliografía para la determinación de triclosán en matrices biológicas y alimentos, el método propuesto es superior en relación al coste del procedimiento y las recuperaciones obtenidas. Por ejemplo, Allmyr y colaboradores [Allmyr M; 2006 A y B] precisaron de triclosán marcado isotópicamente para compensar pérdidas de hasta un 50 % en la extracción de TCS en muestras biológicas. Por otra parte, las recuperaciones y la repetibilidad obtenidas son similares a las descritas por Sanches-Silva [Sanches-Silva; 2005] para la determinación de triclosán en zumo, pechuga de pollo y queso, aunque los límites de cuantificación de su método son 40 veces superiores al presentado en esta memoria.

1.5. Aplicación de la metodología desarrollada

La metodología descrita se aplicó al análisis de seis muestras liofilizadas de trucha arco-iris (*Oncorhynchus mykiss*), caballa (*Scomberomorus cavalla*) y mejillón (*Mytilus edulis*) procedentes de pequeños ríos de la zona de Lugo y estuarios de la Ría de Pontevedra y Vigo, estos últimos próximos a una zona industrializada. Ninguna de las muestras de pescado ni de molusco analizadas presentó niveles de TCS y MTCS por encima de los LOQs del método.

Por otra parte, la presencia de trazas de triclosán en algunas de las muestras de alimentos en lonchas (figura I.8), sugieren su posible contaminación al entrar en contacto directo con superficies o utensilios que estuviesen tratados con este bactericida (cuchillos, tableros de corte, ...) o de un modo indirecto, debido al uso de esponjas o bayetas, conteniendo triclosán, para limpieza de mostradores, tablas de corte y otras superficies en contacto con los alimentos. En los últimos años, los productos poliméricos anti-microbianos han tenido un gran auge, existiendo un amplio abanico de utensilios utilizados en la vida diaria que incorporan, dispersados en su estructura, sustancias con propiedades antimicrobianas como el triclosán. Por ejemplo, el TCS es uno de los posibles bactericidas que incorpora una conocida patente (Silestone®) de encimeras de cocina y baño. Así pues, se evaluó la posibilidad de que se produzca la migración del triclosán desde materiales sólidos hasta los alimentos en un tiempo de contacto relativamente corto. Para realizar un estudio preliminar de esta posibilidad, lonchas de dos alimentos (queso y jamón cocido), con distinto contenido graso, se pusieron en contacto con un tablero de corte que contiene TCS como agente bactericida (nivel estimado $245 \pm 24 \mu\text{g/g}$). Cada cierto tiempo, se tomó una porción de la muestra de alimento para determinar el contenido de triclosán. Los resultados mostraron que existe migración apreciable del compuesto desde las superficies tratadas con este bactericida a los alimentos, figura I.9.

Figura I.9. Migración de triclosán desde una superficie tratada con el bactericida a dos alimentos con contenidos grasos de 43 % (queso) y 2.5 % (jamón).



Como se puede observar en la gráfica, la velocidad de migración del triclosán a los alimentos depende de la cantidad de materia grasa que estos presentan. El queso, con una cantidad de grasa muy superior a la del jamón cocido, acumuló concentraciones de triclosán mayores. Este comportamiento ya había sido descrito por Chung y colaboradores [Chung D; 2003] al estudiar la cinética de migración del triclosán desde un co-polímero de estireno-acrilato. En su estudio, simulaban distintas condiciones experimentales, poniendo el polímero en contacto con diferentes disolventes. Usando heptano, el cual representaba alimentos con alto contenido graso, la migración del triclosán tenía lugar de forma más rápida que empleando una disolución metanol:agua, la cual imitaba los alimentos con alto contenido acuoso. En su estudio, tras un tiempo de contacto de 20 horas, el 65 % del triclosán presente en el polímero migraba al heptano.

En nuestro experimento, como se puede observar en la figura I.9, la migración ha sido relativamente rápida puesto que para tiempos inferiores a 5 minutos, las concentraciones de triclosán en los alimentos fueron de 40-50 ng/g, equivalentes a un 0.02 % del valor existente en la superficie sólida. Estos valores aumentaron con el tiempo hasta alcanzar niveles del orden de 700 ng/g, tras 7 horas de contacto, en el caso de la matriz más grasa. Evidentemente estas concentraciones (< 1 µg/g) todavía resultan muy inferiores a los contenidos de TCS en productos de cuidado personal (entre 0.1-0.3 % en pasta de dientes) por lo que su contribución a la exposición humana a este bactericida es baja.



CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

En esta sección se presentan las conclusiones más relevantes derivadas de los diferentes resultados obtenidos en este estudio, relativas a la determinación y distribución de triclosán y parabenos en varias matrices medioambientales:

DETERMINACIÓN, DISTRIBUCIÓN Y REACTIVIDAD EN MEDIO ACUOSO

I. Aplicación de SPME a la determinación de triclosán y parabenos en agua

La combinación de la SPME con una etapa de sililación *on-fiber* permite alcanzar límites de cuantificación (LOQs) a nivel de los bajos ng/L en la determinación de TCS y sus derivados, así como parabenos en muestras de agua superficial y residual usando GC-MS y GC-MS/MS como técnicas de medida. La etapa de derivatización *on-fiber* requiere tan sólo diez minutos, pudiendo ser llevada a cabo a temperatura ambiente. Cabe destacar que las condiciones de sililación óptimas fueron comunes para ambos grupos de compuestos.

En relación a la etapa de concentración, las mayores eficacias de extracción se obtuvieron utilizando fibras de PA y PDMS-DVB para el TCS y sus derivados, y PA para el caso de parabenos. Aparte del tipo de fibra, la única variable que afectó de manera diferente al rendimiento de la extracción para ambas familias de compuestos fue la fuerza iónica del medio. En base a estos resultados es factible determinar parabenos, TCS y sus derivados (clorofenoles y metiltriclosán) en muestras de agua de forma conjunta, usando PA como recubrimiento de la fibra de SPME. Considerando un volumen de muestra de tan sólo 10 mL, y un tiempo de preparación de 40 minutos, se pueden alcanzar LOQs suficientemente bajos para la determinación de estos bactericidas en muestras reales de agua superficial y residual, con un rango de respuesta lineal de 3 órdenes de magnitud y un rendimiento de extracción escasamente dependiente del tipo de matriz. La mayor limitación del método de SPME es la presencia de niveles moderados de MeP en los blancos de extracción.

II. Concentración mediante SPE

El uso de cartuchos OASIS HLB®, 60 mg, permitió concentrar volúmenes de agua de hasta 2 L en la determinación de TCS y parabenos. Después de su retención sobre el adsorbente, los analitos pueden recuperarse con sólo 2 mL de acetato de etilo y a continuación proceder a su derivatización (sililación) sin la necesidad de realizar un cambio de disolvente. En general, los LOQs obtenidos usando SPE como técnica de concentración se situaron en el mismo rango de valores que los

correspondientes a SPME, además no se han encontrado problemas de contaminación para ninguno de los compuestos estudiados. Las limitaciones más importantes del método de SPE son la necesidad de mayores volúmenes de muestra y la introducción de una etapa adicional de purificación en el caso de aguas residuales. De nuevo, sería factible la determinación conjunta de TCS y parabenos, usando las condiciones de derivatización algo más enérgicas que necesitan los segundos.

III. Reactividad con cloro libre

Tanto TCS como parabenos presentan una reactividad considerable en contacto con agua, a pH neutro, conteniendo niveles de cloro libre inferiores a 1 µg/mL. Para los segundos se ha demostrado que la reacción tiene lugar también entre agua clorada y productos de cuidado personal que incluyen parabenos en su formulación.

TCS y parabenos reaccionan con un exceso de cloro de acuerdo con una pseudo-cinética de primer orden, sin embargo el primero presenta una vida media mucho más corta y además de la formación de derivados halogenados, resultado de reacciones de sustitución electrófila, da lugar a otros compuestos de reconocida toxicidad: 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol. Por su parte, los derivados halogenados de los parabenos presentan una mayor estabilidad a concentraciones elevadas de cloro y, por tanto, una menor tendencia a evolucionar a trihalometanos.

El uso de sistemas GC-MS, tipo trampa de iones, es recomendable para identificar los derivados formados en los procesos de halogenación, sobre todo si no existe información previa relativa a sus estructuras.

IV. Distribución en medio acuático

El TCS y los parabenos alquilados (MeP, EtP, PrP y BuP) fueron detectados en prácticamente todas las muestras de agua residual no tratada procesadas, alcanzado en algunos casos concentraciones superiores a 1 ng/mL para MeP, PrP y TCS. Sin embargo, no se detectó la presencia de BzP, ni de MTCS en ninguna de ellas, tampoco se encontró 2,3,4-TCF, considerado al inicio de este trabajo como un producto de transformación del TCS. A diferencia del TCS, los parabenos se eliminan de forma prácticamente cuantitativa durante la depuración de aguas residuales urbanas. Su presencia en agua superficial, por ejemplo en los ríos, es un claro indicativo de vertidos directos de aguas no tratadas. TCS, 2,4-DCF y 2,4,6-TCF fueron detectados en varias muestras de agua residual tratada a concentraciones de hasta 0.2-0.3 ng/mL, por tanto cabe esperar su presencia en ríos que reciben las descargas de depuradoras equipadas con tratamientos de lodos activos.

DETERMINACIÓN DE TCS, 2,4-DCF Y 2,4,6-TCF EN LODO Y SEDIMENTO

El lodo de depuradora constituyó la más compleja de las matrices consideradas en este estudio, requiriendo el desarrollo de una estrategia de limpieza intensiva, a la vez que obliga a la utilización de GC acoplada a espectrometría de masas en tándem (MS/MS) como técnica de determinación. En relación al procedimiento de extracción asistida por microondas (MAE) optimizado, el tipo de disolvente y su volumen han sido los factores más significativos desde el punto de vista de la eficacia de extracción.

El método desarrollado mostró recuperaciones aceptables, comparables con Soxhlet, desviaciones estándar relativas inferiores al 13 %, y límites de cuantificación, 0.8 ng/g, adecuados para el análisis de lodos y sedimentos. Si embargo, implica una excesiva manipulación de las muestras y no es aplicable a la determinación de MTCS.

El análisis de muestras de lodos reveló la presencia de concentraciones elevadas de TCS (nivel del $\mu\text{g/g}$) en esta matriz, así como de los dos clorofenoles a concentraciones de los altos ng/g. Considerando las vías de transformación medioambiental del TCS, este dato debe tenerse muy en cuenta a la hora de decidir el destino final de este residuo (incineración, utilización como abono, etc.). Además, conocer los niveles de TCS retenidos en los lodos es imprescindible para realizar los balances de eliminación de este bactericida en estaciones depuradoras de agua residual.

DETERMINACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE TCS Y PARABENES EN MUESTRAS DE POLVO

Se han desarrollado dos métodos, aplicando las técnicas de PLE y MSPD, para la extracción de parabenos y TCS en muestras de polvo. En ambos casos, las etapas de limpieza se han integrado en el proceso extracción, minimizando la manipulación de los extractos. La estrategia de *clean-up* ha sido común en ambos métodos, los interferentes con menor polaridad que los analitos se eliminan en una primera etapa de lavado del cartucho de MSPD o las celdas de PLE, mientras que aquellos que presentan una polaridad más elevada permanecen retenidos en una capa de Florisil, situada en el fondo del cartucho o la celda. En el caso de PLE, debido a su gran poder extractivo, los disolventes empleados tanto para la etapa de *clean-up* como de extracción son menos polares que para MSPD, considerada ésta última como una técnica "suave" de extracción. Con respecto a la etapa de derivatización, se ha demostrado la posibilidad de realizar la sililación conjunta de los analitos estudiados en dos disolventes diferentes (acetonitrilo y acetato de etilo) utilizando condiciones poco enérgicas. Usando GC-MS/MS como técnica de determinación, se obtuvieron LOQs inferiores a 4 ng/g para todos los analitos considerando ambos protocolos de preparación de muestra. Las recuperaciones obtenidas para muestras con adición fueron también similares y sólo en el caso de

MeP, el más polar de los compuestos considerados, PLE resultó ligeramente superior a MSPD en términos de eficacia de extracción.

Desde un punto de vista operativo, el método de PLE requiere una menor intervención del operador y es posible procesar varias muestras de forma secuencial. Por su parte, MSPD resulta más barata al no requerir instrumentación dedicada y no presenta riesgo de contaminación cruzada entre muestras, puesto que la extracción se realiza en cartuchos de polipropileno desechables.

La aplicación de ambas metodologías (PLE y MSPD) al análisis de muestras de polvo, procedentes de viviendas particulares y edificios públicos, puso de manifiesto la presencia de estos compuestos en concentraciones del orden de la parte por millón ($\mu\text{g/g}$), similares a los niveles de TCS en lodos, lo que indica una continua exposición a TCS y parabenos por vía dérmica y respiratoria en atmósferas interiores.

DETERMINACIÓN DE TCS Y MTCS EN MATERIAL BIOLÓGICO

El procedimiento de dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) desarrollado en esta tesis constituye la primera aplicación que integra las etapas de extracción y purificación para la determinación de TCS y MTCS en muestras de material biológico. Para este tipo de matriz, la eliminación de lípidos representó la mayor dificultad en el desarrollo de la metodología propuesta. De las dos estrategias inicialmente consideradas: (1) retención de lípidos en el cartucho de MSPD combinando acetonitrilo con Florisil y C18 como eluyente, dispersante y co-adsorbente, respectivamente y (2) oxidación de lípidos sobre sílica impregnada con ácido sulfúrico; la segunda resultó más efectiva, permitiendo obtener recuperaciones cuantitativas con 10 mL de diclorometano y extractos libres de grasa, compatibles con el uso de GC como técnica de determinación.

Aunque en muestras de pescado no se ha detectado la presencia ni de TCS ni MTCS, la capacidad de TCS para migrar desde superficies sólidas hacia alimentos debe ser considerada desde el punto de vista de las aplicaciones permitidas de este bactericida. Más preocupante aún es la estabilidad de ambas especies (TCS y MTCS) en presencia de ácido sulfúrico, comportamiento análogo al de otros contaminantes con una reconocida persistencia medioambiental como son los PBDEs, con los que comparten una cierta semejanza en sus estructuras químicas.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA**A**

- Adolfsson-Erici M, Pettersson M, Parkkonen J, Sturve J; **Chemosphere** 46 (2002) 1485
- Agüera A, Fernández-Alba AR, Piedra L, Mézcua M, Gómez MJ; **Anal Chim Acta** 480 (2003) 193
- Alaee M, D'Sa I, Bennett E, Letcher E; **Organohalogen Comp** 62 (2003) 136
- Allmyr M, Adolfsson-Erici M, Lachlan MS, Sandborgh-Englund G; **Sci Total Environ** 372 (2006) 87
- Allmyr M, Mc Lachlan MS, Sandborgh-Englund G, Adolfsson-Erici M; **Anal Chem** 78 (2006) 6542
- Alum A, Yoon Y, Westerhoff P, Abbaszadegan M; **Environ Toxicol** 19 (2004) 257
- Alzaga R, Peña A, Bayona JM; **J Sep Sci** 26 (2003) 87
- Aranami K, Readman JW; **Chemosphere** 66 (2007) 1052
- Arnold WA, Parker JL; USGS-WRRI/04G **National Grants Competition** (2003)

B

- Balmer ME, Buser HR, Müller MD, Poiger T; **Environ Sci Technol** 39 (2005) 953
- Balmer ME, Poiger T, Droz C, Romanin K, Bergqvist PA, Müller MD, Buser HR; **Environ Sci Technol** 38 (2004) 390
- Barber LB, Keefe SH, Antweiler RC, Taylor HE, Wass RD; **Environ Sci Technol** 40 (2006) 603
- Barceló D; **Trends Anal Chem** 22 (2003) 14
- Barker SA, Long AR, Short CR; **J Chromatogr A** 475 (1989) 353
- Barker SA; **J Biochem Biophys Methods** 70 (2007) 151
- Barron L, Tobin J, Paull B; **J Environ Monit** 10 (2008) 353
- Bartàk P, Čáp L; **J Chromatogr A** 767 (1997) 171
- Bélanger JMR, Raré JRJ; **Anal Bioanal Chem** 386 (2006) 1049
- Bendz D, Paxéus NA, Ginn TR, Loge FJ; **J Hazard Mater** 122 (2005) 195
- Benijts T, Günther W, Lambert W, De Leenheer A; **Rapid Commun Mass Spectrom** 17 (2003) 1866
- Benijts T, Lambert W, De Leenheer A; **Anal Chem** 76 (2004) 704
- Bester K; **Arch Environ Contam Toxicol** 49 (2005) 9
- Bester K; **Water Res** 37 (2003) 3891
- Bianchi F, Careri M, Mucchino C, Musci M; **Chromatographia** 55 (2002) 595

- Birkel M, Erking W, Welzaelsberg N; **Meth Find Exp Pharmacol** 15 (1993) 623
- Björklund E, Sporning S, Wiberg K, Haglund P, von Holst C; **Trends Anal Chem** 25 (2006) 318
- Blanco E, Casais MC, Mejuto MC, Cela R; **Anal Chem** 78 (2006) 2772
- Blau K, Halket J; **Handbook of derivatives for Chromatography**. Ed. Wiley and Sons, 2ª ed, 1993
- Bones J, Thomas K, Nesterenko PN, Paull B; **Talanta** 70 (2006) 1117
- Borremans M, Van Loco J, Loos P, Goeyens L; **Chromatographia** 59 (2004) 47
- Boyd GR, Palmeri JM, Zhang S, Grimm DA; **Sci Total Environ** 333 (2004) 137
- Boyd GR, Reemtsma H, Grima DA, Mitra S; **Sci Total Environ** 311 (2003) 135
- Braun P, Moeder M, Schrader St, Popp P, Kusxhk P, Engewald W; **J Chromatogr A** 988 (2003) 41
- Bröms K, Svärdsudd K, Sundelin C, Norbäck D; **Indoor Air** 16 (2006) 227
- Brown H, Kirkbride P, Pigou PE, Walker S; **J Forensic Sci** 46 (2003) 1
- Burkhardt MK, Re Vello RC, Smith SG, Zangg SD; **Anal Chim Acta** 534 (2005) 89
- Buser HR, Balmer ME, Schmid P, Kohler M; **Environ Sci Technol** 40 (2006) 1427
- Byford JR, Shaw LE, Drew MGB, Pope GS, Saver MJ, Darbre PD; **J Steroid Biochem & Mol Biology** 80 (2002) 49

C

- Cámara C, Fernández P, Martín-Esteban A, Pérez-Conde C, Vidal M; **Toma y tratamiento de muestras**. Ed. Síntesis (2002)
- Camel V; **Analyst** 126 (2001) 1182
- Camel V; **Trends Anal Chem** 19 (2000) 229
- Canosa P, Morales S, Rodríguez I, Rubi E, Cela R, Gómez M; **Anal Bioanal Chem** 383 (2005) 1119
- Canosa P, Pérez-Palacios D, Garrido-López A, Tena MT, Rodríguez I, Rubí E, Cela R; **J Chromatogr A** 1161 (2007) 105
- Canosa P, Rodríguez I, Rubí E, Bollaín MH, Cela R; **J Chromatogr A** 1124 (2006) 3
- Canosa P, Rodríguez I, Rubi E, Cela R; **Anal Chem** 79 (2007) 1675
- Canosa P, Rodríguez I, Rubi E, Cela R; **Anal Chim Acta** 575 (2006) 106
- Canosa P, Rodríguez I, Rubí E, Cela R; **J Chromatogr A** 1072 (2005) 107
- Canosa P, Rodríguez I, Rubi E, Ramil M; Cela R; **J Chromatogr A** 1188 (2008) 132
- Capdeville J, Rothenstein M; **Environ Toxicol and Chem** 21 (2002) 1338

- Carro AM, Lorenzo RA, Fernández F, Rodil R, Cela R; **J Chromatogr A** 1071 (2005) 93
- Cela R, Lorenzo RA, Casais MC; **Técnicas de separación en Química Analítica**. Ed. Síntesis (2002)
- Chang EE, Chiang PC, Chao SH, Lin YL; **Chemosphere** 64 (2006) 1196
- Charnock C, Finsrud T; **J Clin Pharm & Therap** 32 (2007) 567
- Chu S, Metcalfe CD; **J Chromatogr A** 1164 (2007) 212
- Chung D, Papadakis SE, Yan KL; **J Food Sci Technol** 38 (2003) 165
- Ciniglia C, Cascote C, Lo Giudice R, Pinto G, Pollio A; **J Hazard Mater** 122 (2005) 227
- Clesceri LS, Greenberg AE, Eaton AD; **Standard methods for the examination of water and wastewater**. Ed. American Water Works Association, 20th Ed. (1998)
- Concha-Graña E, Turnes-Carou MI, Muniategui-Lorenzo S, López-Mahía P, Fernández-Fernández E, Prada-Rodríguez D; **J Chromatogr A** 1047 (2004) 147
- Coogan MA, Edziyie RE, LaPoint TW, Venables BJ; **Chemosphere** 67 (2007) 1911
- Coogan MA, La Point TW; **Environ Toxicol Chem** 27 (2008) 1788
- Crescenzi C, Bayouhd S, Cormack PAG, Klein T, Ensing K; **Anal Chem** 73 (2001) 2171
- Crofton KM, Paul KB, De Vito MJ, Hedge JM; **Environ Toxicol & Pharm** 24 (2007) 194
- Cunha SC, Fernandes JO, Oliveira MBPP; **Food Addit Contam** 24 (2007) 156

D

- Darbre PD, Aljarrah A, Miller WR, Coldham NG, Saver MJ, Pope GS; **J Appl Toxicol** 24 (2004) 5
- Darbre PD; **Best Practice & Res Clin Endoc & Metab** 20 (2006) 121 B
- Dayan AD; **Food & Chem Toxicol** 45 (2007) 125
- De la Cal A, Eljarrat E, Barceló D; **J Chromatogr A** 1021 (2003) 165
- Doron S, Friedman M, Falach M, Sadovnic E, Zvia H; **Int J Antimicrobial Agents** 18 (2001) 575

E

- Egizabal A, Zuloaga O, Etxebarria V, Fernandez LA, Madariaga JM; **Analyst** 123 (1998) 1679
- Engelmann MD, Hinz D, Wenclaniak BW; **Anal Bioanal Chem** 375 (2003) 460
- Eriksson E, Auffarth K, Eilersen AM, Henze H, Ledin A; **Water SA** 29 (2003) 135

F

- Fate and effects of Triclosan, **Env Proy** 861 (2003); http://www.mst.dk/udgiv/Publications/2003/87-7972-984-3/HTML/kap04_eng.htm

- Federle TW, Kaiser SK, Nuck BS; **Environ Toxicol** 21 (2002) 1330
- Ferrer C, Gómez MJ, García-Reyes JF, Ferrer I, Thurman EM, Fernández-Alba AR; **J Chromatogr A** 1069 (2005) 183
- Ferrer I, Mezcua M, Gómez MJ, Thurman EM, Agüera A, Hernando MD, Fernández-Alba AR; **Rapid Commun Mass Spectrom** 18 (2004) 443
- Fidalgo-Used N, Blanco-Gómez E, Sanz-Medel A; **Anal Chim Acta** 590 (2007) 1
- Fiss EM, Rule KL, Vikesland PJ; **Environ Sci Technol** 41 (2007) 2387
- Fraker SL, Smith GR; **Environ Toxicol** 19 (2004) 250

G

- Gacén J; **Boletín Intexter (UPC)** 120 (2001) 49
- Gallard H, von Gunten U; **Environ Sci Technol** 36 (2002) 884
- Ganzera M, Aberham A, Stuppner H; **J Agric Food Chem** 54 (2006) 3768
- García M, Rodríguez I; Cela R; **Anal Chim Acta** 590 (2007) 17
- García-López M, Canosa P, Rodríguez I; **Anal Bioanal Chem** 391 (2008) 963
- García-Reyes JF, Ferrer C, Gómez-Ramos MJ, Molina-Días A, Fernández-Alba AR; **Trends Anal Chem** 26 (2007) 239
- Garrido-López A, Tena MT; **J Chromatogr A** 1099 (2005) 75
- Gatidou G, Thomaidis NS, Stasinakis AS, Lekkas TD; **J Chromatogr A** 1138 (2007) 32
- Gibson R, Becerril-Bravo E, Silva-Castro V, Jiménez B; **J Chromatogr A** 1169 (2007) 31
- Glaser A; **Pesticides and You** 24 (2004) 12
- Golden R, Gandy J, Vollmer G; **Crit Rev Toxicol** 35 (2005) 435
- Gómez MJ, Martínez Bueno MJ, Lacorte S, Fernández Alba AR, Agüera A; **Chemosphere** 66 (2007) 993
- Gómez-Ariza JL, Bujalance M, Giráldez I, Velasco A, Morales E; **J Chromatogr A** 946 (2002) 209
- Graovac M, Todorovič M, Trtanj MI, Kopečni MM, Čomor J; **J Chromatogr** 705 (1995) 313
- Greychock AE, Vikesland PJ; **Environ Sci Technol** 40 (2006) 2615
- Guerra Simões N, Vale Cardoso V, Ferreira E, Benoliel MJ, Almeida CMM; **Chemosphere** 68 (2007) 501

H

- Halden RU, Paul DH; **Environ Sci Technol** 39 (2005) 1420
- Han F, He YZ, Yu CZ; **Talanta** 74 (2008) 1371
- Hanada Y, Imaizumi I, Kido K, Tanizaki T, Koga M, Shiraishi H, Soma M; **Anal Sci** 18 (2002) 655
- Hansch C, Coubelis JL, Leo A; **Chimie Therapeutique** 6 (1972) 427
- Harvey PW, Darbre P; **J Appl Toxicol** 24 (2004) 167
- Harvey PW, Everett DJ; **J Appl Toxicol** 24 (2004) 1
- Harvey PW, Everett; **Best Prac & Res Clin Endocrinology & Metabolism** 20 (2006) 145
- Heberer T, Stan HJ; **Anal Chim Acta** 341 (1997) 21
- Heidler J, Halden RU; **Chemosphere** 66 (2007) 362
- Hell K, Altwicker ER, Stieglitz L, Addink R; **Chemosphere** 40 (2000) 995
- Henriksen T, Suensmark B, Lindhart B, Juhler RK; **Chemosphere** 44 (2001) 1531
- Horne C, O'Keefe M, Desbrow C, Howella A; **Analyst** 123 (1998) 2517
- Houtman CJ, Van Oostveen AM, Brouwer A, Lamoree MH, Legler J; **Environ Sci Technol** 38 (2004) 6415
- [http:// www.ayaba.es/diario](http://www.ayaba.es/diario)
- <http://eur-lex-europa.eu/smartapi/cgi/sga doc?smartapi!celexplus!prod!DocNumber&lg=estype doc=Directive&an doc=1996&nu doc=45>
- <http://www.cienytech.com/ES/pys-dis-ext-oasis.htm>
- <http://www.epa.gov/>
- http://www.listadeespera.net/guia/pdf/RD1599_1997_17oct.pdf
- <http://www.microban.com>
- <http://www.noharm.org/details.cfm?type=document&id=1601>
- <http://www.silestone.com>
- <http://www.atdsr.cdc.gov/e/toxfaqs/estfacts107.html>
- Hua W, Bennett ER, Letcher RJ; **Environ Inter** 31 (2005) 621
- Huang HY, Chiu CW, Huang IY, JM Yeh; **Electrophoresis** 25 (2004) 3237
- Huber MM, Korhonen S, Ternes TA, von Gunten U; **Water Res** 39 (2005) 3607

I

- Inaba K, Doi T, Isobe N, Yamamoto T; **Water Res** 40 (2006) 2931
- Irgasan, **Iragacare-Toxicological and Ecological data**; official registration, Blonchure 2521.Publication Ag B2521e, Ciba Speciality Chemical Holding Inc. (1998)
- Ishibashi H, Matsumura N, Hirano M, Matsuoka M, Shiratsuchi H, Ishibashi Y, Takao Y, Arizono K; **Aquat Toxicol** 67 (2004) 167

J

- Janjua NRQ, Mortensen GK, Andersson AM, Kongshoj B, Stakkebek, NE, Wulf HC; **Environ Sci Technol** 41 (2007) 5564
- Junker LM, Hay AG; **J Antimicrobial Chemotherapy** 53 (2004) 989

K

- Kanda R, Griffin P, James HA, Fothergill J; **J Environ Monit** 5 (2003) 823
- Kanetoshi A, Ogawa H, Katsura E, Kaneshima H; **J Chromatogr** 389 (1987) 139
- Kanetoshi A; **Archives Environ Contam & Toxicol** 23 (1992) 91
- Kokoletsi MX, Kafkala S, Tsiaganis M; **J Pharm & Biomed Anal** 38 (2005) 763
- Kolpin DW, Skopec M, Meyer MT, Furlong ET, Zaugg SD; **Sci Total Environ** 328 (2004) 119
- Koster EHM; Bruins CHP, de Jong GJ; **Analyst** 127 (2002) 598
- Kronimus A, Schwarzbauer J, Dsikowitzky L, Heim S, Littke R; **Water Res** 38 (2004) 3473
- Kubala-Drinic H, Bazulic D, Sapunar P, Grubelic M, Stuuhe G; **Agric Food & Chem** 51 (2003) 871
- Kuster M, López de Alda MJ, Hernando MD, Petrovic M, Martín-Alonso J, Barceló D; **J Hydrol** 358 (2008) 112

L

- Labat L, Kummer E, Dallet P, Dubost JP; **J Pharm & Biomed Anal** 23 (2000) 763
- Laçadas FM, Olivares IRB, Alves PM; **J Environ Sci & Health Part B** 42 (2007) 491
- Le Boulaire S, Bauduret JC, Andre F; **J Agric Food Chem** 45 (1997) 2134
- Lee HB, Peart TE, Svoboda ML; **J Chromatogr A** 1049 (2005) 122
- Lee HB, Sarafin K, Peart TE, Svodoba ML; **Water Qual Res** 38 (2003) 667
- Letellier M, Budzinski H; **Analusis** 27 (1999) 259
- Ligon AP, Zuehlke S, Spitteller M; **J Sep Sci** 31 (2008) 143

Lindstrom A, Buerge IJ, Poiger T, Bergqvist PA, Müller MD, Buser HR; **Environ Sci Technol** 36 (2002) 2322

Llompart M, Lourido M, Landín P, García-Jares C, Cela R; **J Chromatogr A** 963 (2002) 137

Lokhnauth JK, Snow NH; **Anal Chem** 77 (2005) 5938

Loos R, Hanke G, Eisenreich SJ; **J Environ Monit** 5 (2003) 384

Loraine GA, Pettigro ME; **Environ Sci Technol** 40 (2006) 687

Lord H, Pawliszyn J; **J Chromatogr A** 902 (2000) 17

Lores M, Llompart M, Sánchez-Prado L, García-Jares C, Cela R; **Anal Bioanal Chem** 381 (2005) 1294

Luque de Castro MD, García-Ayuso LE; **Anal Chim Acta** 369 (1998) 1

M

Mahugo-Santana C, Sosa-Ferrera Z, Santana-Rodríguez JS; **Anal Bioanal Chem** 382 (2005) 125

Martínez A, Ramil M, Montes R, Hernanz D, Rubi E, Rodríguez E, Cela R; **J Chromatogr A** 1072 (2005) 83

Mc Avoy D, Schatowitz B, Jacob M, Hauk A, Eckhoff WS; **Environ Toxicol Chem** 21 (2002) 1323

Mezcua M, Gómez MJ, Ferrer I, Agüera A, Hernando MD, Fernández-Alba AR; **Anal Chim Acta** 524 (2004) 241

Mol HGJ, Sunarto S, Steijger OM; **J Chromatogr A** 879 (2002) 97

Morales S, Canosa P, Rodríguez I, Rubi E, Cela R; **J Chromatogr A** 1082 (2005) 128

Morales-Muñoz S, Luque-García JL, Ramos MJ, Martínez-Bueno MJ, Luque de Castro MD; **Chromatographia** 62 (2005) 69

Moretro T, Sorenud T, Mangelrod E, Langsrud S; **J Food Protect** 69 (2006) 627

Moss T, Howe D, Williams FM; **Food and Chem Toxicol** 38 (2000) 361

Musshoff F, Junker HP, Lachenmeier DW, Kroener L, Madea B; **J Chromatogr Sci** 40 (2002) 359

N

Nakada N, Tanishima T, Shinohara H, Kiri K, Takada H; **Water Res** 40 (2006) 3297

Negreira N, Canosa P, Rodríguez I, Ramil M, Rubi E, Cela R; **J Chromatogr A** 1178 (2008) 206

Nishi I, Kawakami T, Onodera S; **Bull Environ Contam Toxicol** 80 (2008) 163

O

Okumura T, Nishikawa Y; **Anal Chim Acta** 325 (1996) 175

Onodera S, Ogawa M, Suzuki S; **J Chromatogr** 392 (1987) 267

Orvos DR, Versteeg DJ, Inauen J, Capdeville M, Rothenstein A, Cunningham V; **Environ Toxicol Chem** 21 (2002) 1338

Orvos DR, Versteeg DJ, Inauen J, Capdeville M, Rothenstein A, Cunningham V; **Environ Toxicol Chem** 47 (2000) 1485

P

Papagiannopoulos M, Mellenthin A; **J Chromatogr A** 976 (2002) 345

Patnaik P, Yang M, Owers E; **Amer Lab** 32 (2000) 16

Pawliszyn J; **Solid Phase Microextraction, theory and practice**. Ed Wiley-VCH (1997)

Paxéus N; **Water Res** 30 (1996) 1115

Paxéus N; **Water Sci Technol** 50 (2004) 253

Peck AM; **Anal Bioanal Chem** 386 (2006) 907

Pena MT, Casais MC, Mejuto MC, Cela R; **J Chromatogr A** 1165 (2007) 32

Peng X, Yu Y, Tang C, Tan J, Huang Q, Wang Z; **Sci Total Environ** 397 (2008) 158

Pensado L, Casais MC, Mejuto MC, Cela R; **J Chromatogr A** 1077 (2005) 103

Petrović M, González S, Barceló D; **Trends Anal Chem** 22 (2003) 685

Petrovic M, Lacorte S, Viana P, Barceló D; **J Chromatogr A** 959 (2002) 15

Pinkston KE, Sedlak DL; **Environ Sci Technol** 38 (2004) 4019

Pizarro C, Gómez-Sáiz JM, Pérez del Notario N; **J Chromatogr A** 1132 (2006) 8

Pizarro C, Pérez del Notario N, Gómez-Sáiz JM; **J Chromatogr A** 1149 (2007) 138

Portillo M, Prohibas N, Salvado V, Simonet BM; **J Chromatogr A** 1103 (2006) 29

Pugazhendhi D, Pope GS, Darbre PD; **J Appl Toxicol** 25 (2005) 301

Q

Quintana JB, Reemtsma T; **Rapid Commun Mass Spectrom** 18 (2004) 765

Quintana JB, Rodil R, Muniategui-Lorenzo S, López-Mahía P, Prada-Rodríguez D; **J Chromatogr A** 1174 (2007) 27

R

Rasmussen HI, Mc Donough R, Gargiullo RJ, Mc Pherson BP; **J High Resol Chromatogr** 19 (1996) 359

- Rebbeck C, Hammond R, Wong J, Nair L, Raghavan N, Hepler D, Campbell W, Lynn R; **Drug Develop & Ind Pharm** 32 (2006) 1095
- Ribeiro A, Neves MH, Almeida MF, Alves A, Santos L; **J Chromatogr A** 975 (2002) 267
- Rice SL, Mitra S; **Anal Chim Acta** 589 (2007) 125
- Richardson SD; **Anal Chem** 22 (2003) 666
- Richardson SD; **Anal Chem** 78 (2006) 4021
- Richardson SD, Ternes TA; **Anal Chem** 77 (2005) 3807
- Richter BE, Jones BA, Ezzell JL, Porter N, Avdalovic N, Pohl C; **Anal Chem** 68 (1996) 1033
- Rodil R, Popp P; **J Chromatogr A** 1124 (2006) 82
- Rodríguez I, Carpintero J, Quintana JB, Carro AM, Lorenzo RA, Cela R; **J Chromatogr A** 1024 (2004) 1
- Rodríguez I, Llompart MP, Cela R; **J Chromatogr A** 885 (2000) 291
- Rodríguez I, Quintana JB, Carpinteiro J, Carro AM, Lorenzo RA, Cela R; **J Chromatogr A** 985 (2003) 265
- Rudel RA, Camann DA, Spengler JD, Korn LR, Brody JG; **Environ Sci Technol** 37 (2003) 4543
- Ruiz MJ, Camean AM, Moreno IM, Picó Y; **J Chromatogr A** 1073 (2005) 257
- Rule KL, Ebbett VR, Vikesland PJ; **Environ Sci Technol** 39 (2005) 3176

S

- Sabaliunas D, Webb SF, Hauk A, Jacob M, Eckhoff WS; **Water Res** 37 (2003) 3145
- Sanches-Silva A, Sendón-García R, López-Hernández J, Paseiro-Losada P; **J Sep Sci** 28 (2005) 65
- Sánchez-Prado L, Llompart M, Lores M, Fernández-Álvarez M, García-Jares C, Cela R; **Anal Bioanal Chem** 384 (2006) 1548
- Sánchez-Prado L, Llompart M, Lores M, García-Jares C, Bayona JM, Cela R; **Chemosphere** 65 (2006) 1338
- Shao Y, Marrito P, Hügel H; **Chromatographia** 57 (2003) S-349
- Shaydullina GM, Sinikova NA, Lebedev AT; **Environ Chem Lett** 3 (2005) 1
- Shelver WL, Kamp LM, Church JL, Rubio FM; **J Agric Food Chem** 55 (2007) 3758
- Shen HY, Jiang HJ, Mao HL, Pan G, Zhou L, Cao YF; **J Sep Sci** 30 (2007) 48
- Shen X, Jibao C, Yun G, Qingde S; **Chromatographia** 64 (2006) 71
- Shipper O; **Environ Sci Technol** 37 (2003) 162A

- Singer H, Müller S, Tixier C, Pillonel L; **Environ Sci Technol** 36 (2002) 4998
- Sioufi A, Caudal F, Grimault D; **J Pharm Sci** 66 (1997) 1166
- Skoog DA, Leary JJ; **Análisis Instrumental**. Ed Mc Graw Hill (1994)
- Smedes F, Thomassen TK; **Marine Poll Bull** 32 (1996) 681
- Soni MG, Taylor SL, Greenberg NA, Burdock GA; **Food and Chem Toxicol** 40 (2002) 1335
- Spaulding RS, Charles MJ; **Anal Bioanal Chem** 372 (2002) 808
- Stackelberg PE, Furlong ET, Meyer MT, Zaugg SD, Henderson AK, Reissman DB; **Sci Total Environ** 329 (2004) 99
- Stasinakis AS, Gatidou G, Mamais D, Thomaidis NS, Lekkas TD; **Water Res** 42 (2008) 1796

T

- Tatarazako N, Ishibashi H, Teshima K, Kishi K, Arizono K; **Environ Sci Technol** 11 (2004) 133
- Ternes TA, Andersen H, Gilberg D, Bonerz M; **Anal Chem** 74 (2002) 3498
- Ternes TA, Bonerz M, Herrman N, Löffler D, Keller E, Bagó Lacida B, Alder AC; **J Chromatogr A** 1067 (2005) 213
- Thomas PM, Foster GD; **J Environ Sci & Health A39** (2004) 1969
- Thompson A, Griffin P, Stuetz R, Cartmell E; **Water Environ Res** 77 (2005) 63
- Thurmann EM, Mills MS; **Solid Phase Extraction, Principles and Practice**. Ed Wiley Interscience Publication (1998)
- Tixier C, Singer HP, Canonica S, Müller SR; **Environ Sci Technol** 36 (2002) 3482
- Tolls J, Haller M, Sjun DTHM; **Anal Chem** 71 (1999) 5242
- Tsai SW, Chang CM; **J Chromatogr A** 1015 (2003) 143

V

- Valkova N; Lépine F, Valeano L, Dupont M, Labrie L, Bisailon JG, Beaudet R, Shareck F, Villemur R; **Appl & Environ Microbiology** 67 (2001) 2404
- Valters K, Li H, Alaee M, D'Sa I, Marsh G, Bergman A, Letcher RJ; **Environ Sci Technol** 39 (2005) 5612
- Van Stee LLP, Leonards PEG, Vreuls RJJ, Brinkman UATH; **Analyst** 341 (1999) 1547
- Vanderford BJ, Snyder SA; **Environ Sci Technol** 40 (2006) 7312
- Veldhoen N, Skirrow RC, Osachoff H, Wigmore H, Clapson DJ, Gunderson MP, Van Aggelen G, Helbing CC; **Aquat Toxicol** 80 (2006) 217

Von Gunten U; **Water Res** 37 (2003) 1469

W

Weigel S, Berger U, Jensen E, Kallenborn R, Thoresen H, Hühnerfuss H; **Chemosphere** 56 (2004) 583

Wells DE, Echarri I; **Anal Chim Acta** 286 (1994) 431

Wilson BA, Smith VH, de Noyelles F Jr, Larive CK; **Environ Sci Technol** 37 (2003) 1713

Wu JL, Lam NP, Martens D, Kettrup A, Cai Z; **Talanta** 71 (2007) 1650

Xu J, Wu L, Chen W, Chang AC; **J Chromatogr A** 1202 (2008) 189

Y

Ye X, Bishop AM, Needham LL, Calafat AM; **Anal Chim Acta** 622 (2008) 150

Ye X, Kuklennyik Z, Needham LL, Calafat AM; **Anal Chem** 77 (2005) 5407

Ye X, Kuklennyik Z, Needham LL, Calafat AM; **J Chromatogr B** 831 (2006) 110

Ye X, Tao LJ, Needham LL, Calafat AM; **Talanta** 76 (2008) 865

Ying GG, Kookana RS; **Environ Int** 33 (2007) 199

Z

Zhang Q, Lian M, Liu L, Cui H; **Anal Chim Acta** 537 (2005) 31

Zhang S, Zhang Q, Darisaw S, Ehie O, Wang G; **Chemosphere** 66 (2007) 1057

Zhao RS, Yuan JP, Li HF, Wang X, Jiang T, Lin JM; **Anal Bioanal Chem** 387 (2007) 2911

Zuckerbraun HL, Babich H, May R, Sinesky MC; **Eur J Oral Sci** 106 (1998) 628

ACRÓNIMOS

ACRÓNIMOS

2,3,4-TCF	2,3,4-triclorofenol
2,4,6-TCF	2,4,6-triclorofenol
2,4-DCF	2,4-diclorofenol
ACN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de etilo
AMD	Desarrollo automatizado de métodos
ANOVA	Análisis de varianza
APCI	Ionización química a presión atmosférica
ASE	Extracción acelerada con disolventes
BSTFA	Bis-(trimetilsilil)trifluoroacetamida
BuP	Butilparaben
BzP	Bencilparaben
CAR-PDMS	Carboxen-Polidimetilsiloxano
CCD	Diseño Central Compuesto
CE	Comunidad Europea
CW-DVB	Carbowax-Divinilbenceno
DCM	Diclorometano
DVB-CAR-PDMS	Divinilbenceno-Carboxen-Polidimetilsiloxano
EI	Impacto electrónico
EPA	Agencia de Protección Medioambiental
ESI	Electrospray
EtP	Etilparaben
GC	Cromatografía de gases
GPC	Cromatografía de permeación en gel
LC	Cromatografía de líquidos
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
LLE	Extracción líquido-líquido
MAE	Extracción asistida por microondas
MeOH	Metanol
MeP	Metilparaben
MS	Espectrometría de masas
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem

MSPD Dispersión de la matriz en fase sólida
MTBSTFA N-(terbutildimetilsilil)-N-metiltrifluoroacetamida
MTCS Metiltriclosán
NIST Instituto Nacional de Estándares y Tecnología
PAH Hidrocarburo policíclico aromático
PB Paraben
PBDE Bifeniléter polibromado
PCB Bifenilo policlorado
PDMS Polidimetilsiloxano
PDMS-DVB Polidimetilsiloxano-Divinilbenceno
PLE Extracción presurizada con disolventes
POPs Contaminantes orgánicos persistentes
PPCPs Productos farmacéuticos y de cuidado personal
PrP Propilparaben
RD Real Decreto
RSD Desviación estándar relativa
SD Desviación estándar
SIM Registro selectivo de iones
SPE Extracción en fase sólida
SPME Microextracción en fase sólida
SSI Ionización con spray iónico
TCC Triclocarban
TCS Triclosán
t_r Tiempo de retención
US Ultrasonidos

