

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**Departamento de Química Analítica**



**NUEVAS METODOLOGÍAS PARA LA  
DETERMINACIÓN DE NONILFENOL, SUS  
DERIVADOS ETOXILADOS Y PARABENOS EN  
MUESTRAS MEDIOAMBIENTALES.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**  
**PRESENTADA POR**

**Laura Núñez García-Cuerva**

Bajo la dirección de los doctores

José Luis Tadeo Lluch  
Esther Turiel Trujillo

**Madrid, 2010**

**ISBN: 978-84-693-9263-8**

© Laura Núñez García-Cuerva, 2010

Universidad Complutense de Madrid  
Facultad de Ciencias Químicas  
Departamento de Química Analítica



# NUEVAS METODOLOGÍAS PARA LA DETERMINACIÓN DE NONILFENOL, SUS DERIVADOS ETOXILADOS Y PARABENOS EN MUESTRAS MEDIOAMBIENTALES



LAURA NÚÑEZ GARCÍA-CUERVA

Madrid 2010



**Universidad Complutense de Madrid**  
**Facultad de Ciencias Químicas**  
**Departamento de Química Analítica**



# **NUEVAS METODOLOGÍAS PARA LA DETERMINACIÓN DE NONILFENOL, SUS DERIVADOS ETOXILADOS Y PARABENOS EN MUESTRAS MEDIOAMBIENTALES**

**Laura Núñez García-Cuerva**

Directores:  
José Luis Tadeo Lluch  
Esther Turiel Trujillo

**Madrid, 2010**



**Dr. José Luis Tadeo Lluch.** Investigador del Departamento de Medio Ambiente del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA).

**Dra. Esther Turiel Trujillo.** Investigador del Departamento de Medio Ambiente del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA).

HACEN CONSTAR: que el presente trabajo titulado “Nuevas metodologías para la determinación de nonilfenol, sus derivados etoxilados y parabenos en muestras medioambientales” ha sido realizado por la Lcda. Laura Núñez García-Cuerva en el Departamento de Medio Ambiente del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), bajo nuestra dirección, constituyendo la Tesis Doctoral de su autora.

Madrid, 2 de Febrero de 2010

Fdo. Dr. José Luis Tadeo Lluch

Fdo. Dra. Esther Turiel Trujillo



## AGRADECIMIENTOS.

Ahora que veo todo escrito y terminado tengo sentimientos encontrados; por un lado estoy muy contenta por haber terminado pero por otro me da mucha pena, hasta se me caen las lagrimillas, porque han sido 4 años, con sus más y sus menos, pero en general han sido MARAVILLOSOS tanto personal como profesionalmente.

Son muchas las personas a las que tengo que agradecer cosas y lógicamente los primeros son mis directores, José Luis Tadeo y Esther Turiel, que sin ellos esto no hubiese sido posible (otra vez las lágrimas). Ellos han confiado en mi y me han enseñado y ayudado muchísimo en todo y aunque he podido ser un poco (muy) pesada en algunos momentos, siempre me han tratado con mucho cariño y mimo y, que yo recuerde, nunca hemos discutido y mira que son 4 años, MUCHAS GRACIAS POR TODO.

Alguien que me ha ayudado mucho y que no le he puesto en el párrafo anterior, pero que sabe que ha sido muy importante en este librito es Antonio Martín-Esteban, ¿cuántas veces habré ido a vuestro despacho a preguntar cosas?. Espero que me sigas avisando de los conciertos de Criteria.

También tengo que agradecer a Ana Isabel García-Valcarcel su ayuda con el LC-MS/MS, a Esther de Miguel que siempre que he necesitado o no encontraba algo ella sabía donde estaba, a Bea que con el papeleo de la tesis la he bombardeado un poquito y a Consuelo, Lorena, Rosa y Encarni que también me han animado.

And now, my 3 months in Helsinki, in the Department of Analytical Chemistry, in the Faculty of Sciences (University of Helsinki). Three incredible months both profesional and personal, and obviously I should thank my adopted directors, Marja-Liisa Riekkola y Susanne K. Wiedmer, who allowed me to work with them and taught me everything about the Micelar Electrokinetic Chromatography, and in general to everybody of the lab who recieved me with affection Kari, Jevgeni, Katti, Lucia, Finnish Jaana, Lucia, Joana, Maarit, Jonas and Czech Jaana (you helped me a lot with the *steking*) I am very fond of you!!!. And here, also I'm going to include Sara who was

in the same department with a short-stay as me, and Dani, Esther, Dani, Bea, Pablo, Naveen and everybody who was there.

Bueno, ya voy a ir terminando y por supuesto no se me van a olvidar mis compis de laboratorio Myriam y Paco (ahora me vienen otra vez las lágrimas), hemos pasado tantas horas juntos que creo que nos sabemos las vidas los unos de los otros perfectamente y también nos hemos divertido mucho. Me han ayudado mucho y cuando hemos tenido la nube negra sobre el laboratorio (ese tiempo en el que nunca sale nada) han sido un apoyo fundamental. En este bloque voy a incluir también a Isdín que estuvo sólo tres meses pero me reí muchísimo con él y a Esteban con sus imitaciones, en las que estoy incluida. MUCHÍSIMAS GRACIAS.

A mis amigos del colegio, del instituto y de la Universidad que me han apoyado y ayudado y que siempre están cuando se les necesita, Estrella muchas gracias por enviarme artículos cuando yo no los encontraba.

Y por último, pero los más importantes, mis padres y hermanos porque ellos son los que más han aguantado mis subidas y mis bajadas.

**MUCHAS GRACIAS A TODOS!!!!!!**

## LISTA DE PUBLICACIONES ORIGINALES

Esta tesis doctoral se ha presentado según el formato de publicaciones, las cuales se enumeran a continuación. En todas ellas, la autora de esta tesis doctoral es la primera autora.

1.- Núñez L., Turiel E., Tadeo J.L. “Determination of Nonylphenol and Nonylphenol ethoxylates in environmental solid samples by ultrasonic-assisted extraction and HPLC-FL”, *J. Chromatogr. A* 1146 (2007) 157-163. <http://sciencedirect.com/>

2.- Núñez L., Turiel E., Martín-Esteban A., Tadeo J.L. “Molecularly imprinted polymer for the selective extraction of the endocrine disrupters nonylphenol and its ethoxylated derivatives from environmental solids”, *J. Sep. Sci* 31 (2008) 2492-2499. <http://onlinelibrary.wiley.com/>

3.- Núñez L., Tadeo J.L., García- Valcarcel A.I, Turiel E “Determination of Parabens in environmental solid samples by ultrasonic-assisted extraction and liquid chromatography with triple quadrupole mass spectrometry”, *J. Chromatogr. A* 1214 (2008) 178-182. <http://onlinelibrary.wiley.com/>

4.- Núñez L., Weidner, S.K., Parshintsev, J., Hartonen, K., Riekkola, M-L., Tadeo J.L., Turiel E., “Determination of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in waste water using MEKC”, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 2109-2116. <http://sciencedirect.com/>

5.- Núñez L., Turiel E., Martín-Esteban A., Tadeo J.L. “Molecularly imprinted polymer for the extraction of parabens from environmental solid samples prior to their determination by high performance liquid chromatography-ultraviolet detection”, *Talanta.* 80 (2010) 1782-1788. <http://sciencedirect.com/>



ÍNDICE

<b>I. OBJETIVOS.....</b>	<b>1</b>
<b>II. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>5</b>
<b>1.CONTAMINANTES EMERGENTES.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1 Generalidades.....</b>	<b>7</b>
<b>1.2 Clasificación.....</b>	<b>8</b>
<b>1.3 Alteradores Endocrinos.....</b>	<b>10</b>
<b>1.4 Nonilfenoles: NP, 4-n-NP y NPEO<sub>x</sub>.....</b>	<b>14</b>
<i>1.4.1. Estructura y propiedades físico – químicas del NP, 4-n-NP y los NPEO<sub>x</sub>.....</i>	<i>14</i>
<i>1.4.2. Fuentes y usos.....</i>	<i>16</i>
<i>1.4.3. Presencia y evolución del NP, 4-n-NP y sus derivados etoxilados en el medio ambiente.....</i>	<i>18</i>
<i>1.4.4. Toxicidad.....</i>	<i>24</i>
<i>1.4.5. Legislación.....</i>	<i>27</i>
<b>1.5. Parabenos.....</b>	<b>28</b>
<i>1.5.1. Estructura y propiedades físico – químicas.....</i>	<i>28</i>
<i>1.5.2. Fuentes y usos.....</i>	<i>30</i>
<i>1.5.3. Presencia y evolución de los parabenos en el medio ambiente.....</i>	<i>31</i>
<i>1.5.4. Toxicidad.....</i>	<i>34</i>
<i>1.5.5. Legislación.....</i>	<i>39</i>
<b>1.6. Bibliografía.....</b>	<b>40</b>
<b>2. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS EN MUESTRAS AMBIENTALES.....</b>	<b>45</b>
<b>2.1. Conceptos generales.....</b>	<b>45</b>
<b>2.2. Extracción sólido-líquido.....</b>	<b>46</b>
<b>2.3. Extracción con fluidos supercríticos.....</b>	<b>51</b>

---

<b>2.4. Extracción con agua subcrítica.....</b>	<b>52</b>
<b>2.5. Dispersión de matriz en fase sólida.....</b>	<b>53</b>
<b>2.6. Extracción líquido-líquido.....</b>	<b>53</b>
<b>2.7. Extracción en fase sólida.....</b>	<b>55</b>
<b>2.8. Polímeros de impresión molecular (MIPs) .....</b>	<b>58</b>
<b>2.8.1. Generalidades.....</b>	<b>58</b>
<b>2.8.2. Síntesis de los polímeros de impresión molecular.....</b>	<b>59</b>
<b>2.8.3. Componentes de la mezcla de polimerización.....</b>	<b>64</b>
<b>2.8.4. Técnicas de síntesis de polímeros de impresión molecular..</b>	<b>70</b>
<b>2.8.5. Aplicaciones de los MIPs.....</b>	<b>79</b>
<b>2.8.6. Extracción en fase sólida sobre polímeros de impresión</b> <b>molecular (MISPE) (Molecularly Imprinted Solid Phase</b> <b>Extraction).....</b>	<b>80</b>
2.8.6.1. Optimización de un proceso MISPE.....	82
2.8.6.2. Aplicaciones MISPE.....	84
<b>2.9. Bibliografía.....</b>	<b>89</b>
<b>3. REVISIÓN DE MÉTODOS.....</b>	<b>95</b>
<b>3.1. Revisión de métodos empleados para la determinación de NP,</b> <b>4-n-NP y NPEOx en muestras de interés ambiental.....</b>	<b>95</b>
<b>3.1.1. Técnicas de extracción.....</b>	<b>96</b>
3.1.1.1. Muestras líquidas.....	96
3.1.1.2. Muestras sólidas.....	98
3.1.1.3. Muestras gaseosas.....	101
<b>3.1.2. Técnicas de separación.....</b>	<b>101</b>
3.1.2.1. Cromatografía de líquidos.....	101
3.1.2.2. Cromatografía de gases.....	102
3.1.2.3. Electroforesis capilar.....	103
3.1.2.4. Inmunoensayos.....	104
<b>3.1.3. Detectores.....</b>	<b>104</b>

<b>3.2. Revisión de métodos empleados para la determinación de parabenos en muestras de interés ambiental.....</b>	<b>107</b>
<b>3.2.1. Técnicas de extracción.....</b>	<b>107</b>
3.2.1.1. Muestras líquidas.....	107
3.2.1.2. Muestras sólidas.....	109
3.2.1.3. Muestras gaseosas.....	110
<b>3.2.2. Técnicas de separación.....</b>	<b>110</b>
3.2.2.1. Cromatografía de líquidos.....	110
3.2.2.2. Cromatografía de gases.....	111
3.2.2.3. Electroforesis capilar.....	112
<b>3.1.3. Detectores.....</b>	<b>112</b>
<b>3.3. Bibliografía.....</b>	<b>115</b>
<b>III. EXPERIMENTAL.....</b>	<b>121</b>
<b>1. CAPÍTULO I. Determinación de nonilfenoles y nonilfenoles etoxilados en muestras sólidas de interés medioambiental mediante extracción asistida por ultrasonidos y HPLC-FL. ....</b>	<b>123</b>
<b>2. CAPÍTULO II. Polímero de impresión molecular para la extracción selectiva del nonilfenol y sus derivados etoxilados en matrices medioambientales sólidas.....</b>	<b>131</b>
<b>3. CAPÍTULO III. Determinación de nonilfenoles y sus derivados etoxilados de cadena larga mediante cromatografía electrocinética micelar (MEKC).....</b>	<b>141</b>
<b>4. CAPÍTULO IV. Determinación de parabenos en muestras sólidas de interés medioambiental mediante extracción asistida por ultrasonidos y LC-MS/MS. ....</b>	<b>149</b>

---

<b>5. CAPÍTULO V. Polímero de impresión molecular para la extracción selectiva de parabenos en matrices medio ambientales sólidas y posterior determinación con HPLC-UV.....</b>	<b>155</b>
<b>IV. DISCUSIÓN INTEGRADORA.....</b>	<b>161</b>
<b>1. DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE NONILFENOL Y SUS DERIVADOS ETOXILADOS EN MUESTRAS DE INTERÉS MEDIOAMBIENTAL.....</b>	<b>163</b>
<b>1.1. Capítulo I.....</b>	<b>164</b>
<b>1.2. Capítulo II.....</b>	<b>166</b>
<b>1.3. Capítulo III.....</b>	<b>169</b>
<b>2. DESARROLLO DE MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE PARABENOS EN MUESTRAS DE INTERÉS MEDIOAMBIENTAL.....</b>	<b>173</b>
<b>2.1. Capítulo IV.....</b>	<b>173</b>
<b>2.2. Capítulo V.....</b>	<b>175</b>
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>179</b>
<b>VI. ACRÓNIMOS</b>	

## **I. OBJETIVOS**



## I. OBJETIVOS

En las últimas décadas nuestra calidad de vida ha experimentado una clara mejoría, gracias en parte a lo que algunos autores denominan “revolución química”. Actualmente, por ejemplo, tenemos cosechas más abundantes o podemos consumir en cualquier momento productos de temporada que antes era sólo posible encontrar durante unos meses. Por otra parte, se tiende a una mayor comodidad en el hogar y una menor pérdida de tiempo en las actividades cotidianas, y de ahí, el uso de detergentes más potentes con distintos aromas, suavizantes que cuiden la ropa y faciliten el planchado conservando el color, etc. También hay que resaltar la aparición de nuevos fármacos que han permitido que la calidad de vida y la longevidad de las personas aumenten año tras año. Además cada vez se le da una mayor importancia al físico, por lo que la aparición en el mercado de nuevos productos de cuidado personal se produce de manera constante.

En general esta revolución química ha constituido un hecho positivo, si bien en algunos casos, compuestos químicos que en un principio parecían inofensivos, con el paso del tiempo y tras diversos estudios se ha demostrado su toxicidad. Esto conlleva una necesidad clara de control de los distintos compuestos químicos que se emplean actualmente, ya que muchos de ellos pueden acumularse tanto en los seres humanos como en el medio ambiente. Uno de los principales focos de exposición de los seres humanos a estos compuestos son los distintos compartimentos medioambientales como las aguas, suelos de cultivo, sedimentos o los lodos utilizados en agricultura. Estas matrices pueden acumular los contaminantes que luego pueden pasar a los cultivos, pescados, etc. introduciéndose así finalmente en la cadena trófica.

El estudio de estos nuevos compuestos químicos, denominados contaminantes emergentes, se ha convertido en objetivo prioritario para la Organización Mundial de la Salud (OMS) y para las agencias de protección medioambiental (EPA). Es por ello que resulta necesario el desarrollo de métodos analíticos de elevada sensibilidad y selectividad para la determinación de estos compuestos, ya que lamentablemente son pocos los existentes actualmente. Lo ideal sería disponer de métodos respetuosos con el medio ambiente, en los que se minimice o evite el empleo de disolventes orgánicos,

métodos rápidos de fácil implantación en cualquier laboratorio de análisis de rutina y en los que se empleen materiales de uso común.

En este trabajo se han estudiado dos familias pertenecientes a este grupo de contaminantes emergentes: los nonilfenoles, compuestos utilizados fundamentalmente como surfactantes en detergentes, y la familia de los parabenos, bactericidas y conservantes utilizados en productos de cuidado personal, alimentos y compuestos farmacéuticos. Así, la investigación se dividió en dos partes dedicadas al desarrollo de métodos analíticos para los nonilfenoles en la primera y a los parabenos en distintas muestras de interés medioambiental en la segunda, siendo en ambas partes los objetivos a seguir similares:

- El desarrollo de métodos analíticos que permitieran la separación y determinación de compuestos pertenecientes a estas familias de contaminantes, para los que se emplearon como técnicas de separación, la cromatografía líquida de alta resolución y la cromatografía electrocinética micelar y como detección, los detectores de fluorescencia, ultravioleta, DAD y MS/MS.
- Utilización de métodos de extracción convencionales como son la extracción asistida por ultrasonidos, extracción asistida por microondas, extracción líquido-líquido o la extracción en fase sólida.
- Desarrollo de métodos de extracción selectiva basados en los polímeros de impresión molecular en formato de extracción en fase sólida, MISPE.
- Determinación y cuantificación de los compuestos pertenecientes a ambas familias en muestras de interés ambiental tales como suelos, sedimentos, aguas y lodos de distinta procedencia.

## **II. INTRODUCCIÓN**



## 1. CONTAMINANTES EMERGENTES.

### 1.1. Generalidades.

Muchos de los productos que utilizamos a diario (detergentes, perfumes, cremas) contienen gran cantidad de conservantes y aditivos que están siendo vertidos de manera continua al medio ambiente. La preocupación por conocer los efectos que puede tener la presencia de estos compuestos sobre el medio ambiente y sobre la salud humana ha ido en aumento en estos últimos años, y con ella el número de investigaciones al respecto, siendo actualmente línea prioritaria de investigación para la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Unión Europea (UE) y la US Environmental Protection Agency (USEPA).

En la mayoría de los casos, los contaminantes emergentes son sustancias que en la actualidad no se encuentran reguladas, pero que en función de los resultados que se obtengan en futuros estudios (toxicidad y presencia en el medio ambiente) pueden llegar a estarlo (Barceló, 2003). Estos compuestos se caracterizan por generar efectos negativos en los seres vivos y en el ecosistema, aún sin ser muy persistentes, ya que debido a su extendido uso, se introducen continuamente en el medio ambiente. De hecho, anualmente se introducen entre 200 y 1000 nuevas sustancias químicas. Son muy pocos los estudios que existen sobre los efectos que producen estos compuestos en el medio ambiente, por lo que se desconoce los riesgos asociados a su presencia en los distintos compartimentos en las que se acumulan (Benfenati y col., 2003; Eljarrat y col., 2003; Barceló y col., 2006). Por otra parte, son escasos los métodos analíticos que existen para su identificación, por lo que realmente se carece de datos ambientales reales. Por lo general no hay legislación sobre las concentraciones permitidas en distintos compartimentos medioambientales por lo que estos compuestos no se eliminan en las plantas de tratamiento de aguas residuales. Es posible, por tanto, encontrarlos en aguas de riego que se emplean en plantaciones agrícolas o pueden permanecer en los lodos que se generan en estas plantas de tratamiento que posteriormente pueden ser utilizados en agricultura (Petrovic y col., 2004; Petrovic y col., 2006).

La publicación de libros como “*Primavera Silenciosa*”, escrito en 1962 por Rachel L. Carson (Carson, 1962) o “*Nuestro Futuro Robado*” de Theo Colborn, Dianne

Dumanoski y Pete Myersen (Colborn y col., 2007) dieron la voz de alarma sobre estos compuestos que hasta el momento habían sido utilizados sin tener en cuenta los posibles efectos. En el primero de ellos se hacía referencia a cómo el DDT pasó de ser un potente pesticida a convertirse en un mortal contaminante, y en el segundo se relatan distintas experiencias de campo, pruebas de laboratorio, estadísticas humanas, etc. que muestran el peligro que pueden tener los alteradores endocrinos. De todas formas, aunque la presencia de estas sustancias sea causa de alarma, siempre es necesario analizar los pros y contras que presentan o que han presentado, porque aunque ahora se ha comprobado la toxicidad del DDT, durante la II Guerra Mundial salvó muchas vidas al reducir los casos de malaria y tal vez hoy también podría salvar muchas vidas en África. Los adelantos científicos casi siempre tienen un lado positivo y un lado negativo por lo que es necesario evaluar en cada momento el uso que se va a hacer de ellos de una manera objetiva.

## 1.2. Clasificación.

Los contaminantes emergentes se pueden clasificar atendiendo a distintos parámetros, si bien la clasificación más aceptada es la que se realiza en función de sus usos y que se detalla a continuación (Barceló, 2003).

1. Fármacos. Cada vez es mayor la fabricación de nuevos fármacos de los que se conoce su función beneficiosa pero no así sus efectos posteriores sobre el medio ambiente. Entre ellos cabe destacar los siguientes:
  - Antibióticos para uso médico y veterinario: eritromicina, lincomicina, etc.
  - Analgésicos y anti-inflamatorios: codeína, ibuprofeno, ácido acetilsalílico, etc.
  - Fármacos psiquiátricos: diazepam, etc.
  - Reguladores de grasas: bezafibrato.
  - Esteroides y hormonas: que se utilizan para corregir deficiencias en su secreción natural. Ejemplos: estradiol, estrona, estriol, etc.

2. Anticonceptivos: que contienen en su composición hormonas y esteroides como el estradiol y el estriol (píldoras anticonceptivas).
3. Productos de cuidado personal. Cada vez es mayor la importancia que se le da a la imagen y por ello éste es un mercado de gran producción y que genera un gran número de residuos.
  - Perfumes: nitro, policiclos y macrociclos de almizcle.
  - Cremas: benzofenona, parabenos.
  - Repelentes de insectos: N, N- dietiltoluidina.
4. Antisépticos. Se utilizan con el fin de destruir la flora bacteriana cuando se aplican sobre heridas infectadas, instrumental quirúrgico, etc. Ejemplos: triclosan, clorofeno.
5. Surfactantes y metabolitos de surfactantes. Utilizados ampliamente en la fabricación de detergentes. Ejemplos: alquilfenol etoxilados, alquilfenol (nonilfenol y octilfenol), alquilfenol carboxilados.
6. Compuestos ignífugos. Debido al gran número de normativas que existen en temas de protección de incendios, es necesario el empleo de estos compuestos en la construcción (paredes, pinturas, etc.). Ejemplos: PBDEs, bisfenol A, tris 2-cloroetilfosfato.
7. Agentes y aditivos industriales. Utilizados en la industria para conferir buenas propiedades a distintos productos como pinturas, plásticos, etc. Ejemplos: EDTA, sulfonatos aromáticos, benzotriazoles, dioxano.
8. Aditivos de gasolinas. Que se adicionan para mejorar sus propiedades. Ejemplos: dialquil éteres, metil-terc-butyl-eter (MTBE).
9. Agentes desinfectantes: bromoácidos, bromoaldehidos, bromoacetnitrilos.

Además de los contaminantes emergentes mencionados hay que tener en cuenta que muchos compuestos pueden sufrir transformaciones y dar lugar a productos de degradación con un comportamiento distinto y una toxicidad que puede ser incluso superior a la del compuesto original. Este hecho ha sido comprobado en los nonilfenoles polyetoxilados, los cuales se degradan a nonilfenol y derivados etoxilados de cadena corta (NPEOx  $x = 1$  ó  $2$ ) que presentan una toxicidad mucho mayor que los compuestos originales. Por otro lado también hay que tener en cuenta los casos en los que se pueden dar efectos sinérgicos. Este es el caso de la melamina que se utiliza para la fabricación de resinas, y el ácido cianúrico (producto de degradación de la melamina) utilizado como estabilizante del cloro en piscinas. La presencia conjunta de ambos compuestos origina unos cristales que pueden tener efectos letales si son consumidos por seres vivos. Este hecho se demostró en el 2008 al encontrar lotes de comida para animales e incluso alimentos infantiles contaminada (Richardson y col., 2009).

### **1.3. Alteradores Endocrinos.**

Uno de los efectos más preocupantes que pueden tener estos contaminantes es su acción como alteradores endocrinos. Estos compuestos pueden alterar el sistema hormonal y por tanto la salud de los organismos vivos al mimetizar el comportamiento de los estrógenos naturales. Los alteradores endocrinos comprenden desde productos químicos sintetizados por el hombre hasta sustancias que se encuentran de manera natural en el medio ambiente.

Los alteradores endocrinos pueden actuar sobre el equilibrio hormonal de los seres vivos a distintos niveles:

- Mimetizar la acción de las hormonas.
- Antagonizar la acción de las hormonas.
- Alterar el patrón de síntesis y metabolismo hormonal.
- Modular los niveles de los receptores correspondientes.

Sus efectos varían en función del alterador y del ser vivo, pero existen una serie de características comunes como son:

- Los efectos de los contaminantes pueden ser distintos sobre el embrión, el feto, el organismo perinatal, niños o adultos.
- Los efectos se manifiestan con mayor frecuencia en la progenie que el progenitor expuesto.
- El momento de la exposición en el organismo en desarrollo es decisivo para determinar el carácter, la gravedad y su evolución.
- Aunque la exposición crítica tenga lugar durante el desarrollo embrionario, las manifestaciones pueden no ser evidentes hasta la madurez del individuo.

Compuestos tales como dietilbestrol (DES), 2,2-bis-(p-clorofenil)-1,1,1-tricloroetano (DDT), e incluso compuestos naturales presentes en la soja o la granada, presentan efectos estrogénicos que se han ido descubriendo a lo largo de los años y en la mayoría de los casos después de que su acción hubiese hecho efecto. Este fue el caso del DES que durante más de 20 años (1938-1962) se administró durante el embarazo y que provocó malformaciones en más de 8 mil niños de 46 países.

Entre los posible efectos que pueden ocasionar sobre la salud humana destacan: disminución de la calidad del esperma, criptorquidismo e hipospadias, cáncer testicular, cáncer de próstata, cáncer de mama, endometriosis, efectos sobre la fertilidad, efectos sobre la relación de sexos, efectos sobre el tiroides, efectos neuroendocinos, pubertad adelantada y obesidad (Pombo y col.).

Desde el año 1999 existe en la Unión Europea una comisión que establece los riesgos de este tipo de sustancias y ha elaborado distintos cuadros de actuación en los que se incluye el NP (Estrategia Comunitaria, 1999). En el 2007 se presentó la última actualización para la implantación de esta estrategia (Estrategia Comunitaria, 2007).

- Cuadro 1. Acciones prioritarias en relación con determinados grupos de sustancias recogidas en los cuadros siguientes y duración prevista (años).

- Cuadro 2. Sustancias de las que se tienen pruebas que confirman su capacidad-efectiva o potencial para causar alteraciones endocrinas que no se encuentran legisladas. Ejemplos: Resorcinol, 2,4 diclorofenol, etc.
- Cuadro 3. Sustancias de las que se tienen pruebas que confirman su capacidad-efectiva o potencial para causar alteraciones endocrinas que se encuentran legisladas. Ejemplos: Estireno, trembolona, **nonilfenol**, etc.
- Cuadro 4. Sustancias no suficientemente documentadas que se encuentran en investigación. Ejemplos: resmetrina, etc.

En la tabla 1 se resumen alguno de los alteradores endocrinos más conocidos así como sus usos, vías de exposición humana y aparición en el medio ambiente.

Tabla 1. Alteradores endocrinos. Usos y exposición.

Sustancias	Utilización	Exposición Humana	Exposición Medio Ambiente
DBT (ftalato)	Plastificante empleado en juguetes, laca de pelo, colas, recubrimientos, perfumes, etc.	Alimentos (envases), juguetes, cosméticos, cola, trabajadores durante la fabricación.	
Bisfenol A	Resina en empastes y recubrimientos dentales, latas de alimentos.	Alimentos	
PBB	Compuesto ignífugo.	Exposición de trabajadores durante la fabricación	Producción (aguas residuales) y como residuos.
PCB	Equipos eléctricos, sistemas hidráulicos, pinturas, plásticos.	Alimentos	Emisión en la producción y en fase de residuo.
Resorcinol	Fabricación de adhesivos, tintas, fármacos, etc.	Exposición a través de la piel, a través de emisiones en la producción y como residuo, inhalación de humo de madera y tabaco.	Emisiones durante la producción y en la fase de residuo.
Estireno	Fabricación de adhesivos, tintas, cosméticos y fármacos.	Alimentos (aditivos, envases), juguetes, emisiones de vehículos.	Emisiones durante la producción y en la fase de residuo.
Tributilestaño	Pinturas fungicidas, conservante de la madera, desinfectante y como biocida para sistemas de refrigeración.	Trabajadores durante la producción	En la producción, aplicación y como residuo.
Percloroetileno	Limpieza y desengrase de de piezas y superficies metálicas, limpieza en seco.	Exposición indirecta a través del aire y alimentos.	Emisiones durante producción y uso.
Endosulfan	Utilización en agricultura.	En alimentos	Emisiones durante el uso y la producción.
Nonilfenol	Materia prima para plásticos y nonilfenoles polietoxilados utilizados como surfactantes.	Envases y muestras medioambientales.	Producto de degradación de los nonilfenoles polietoxilados.

#### **1.4. Nonilfenoles: NP, 4-n-NP y NPEO<sub>x</sub>.**

A la hora de hablar de la familia de los nonilfenoles es necesario diferenciar entre la mezcla de isómeros de cadena y de posición del nonilfenol, al que llamaremos NP, y el nonilfenol de cadena lineal en posición 4 del anillo que recibe el nombre de 4-n-NP. Estos compuestos junto con los nonilfenoles etoxilados de cadena corta, entre los que destacan el NPEO<sub>1</sub> y NPEO<sub>2</sub>, son productos de degradación de los nonilfenoles polietoxilados de cadena larga (NPEO<sub>x</sub>).

Como se mencionó anteriormente todos los isómeros del nonilfenol (NP y 4-n-NP) y los nonilfenoles polietoxilados (NPEO<sub>x</sub>) han sido incluidos dentro del grupo de los denominados “contaminantes emergentes”, debido a su uso generalizado, su presencia en el medio ambiente y su toxicidad. Los nonilfenoles polietoxilados de cadena larga son surfactantes utilizados de forma generalizada y transformados por microorganismos en el medio ambiente para formar nonilfenoles y nonilfenoles etoxilados de cadena corta. El NP se utiliza en muchas actividades industriales tales como formación de resinas epoxy y la industria del cuero, y también se emplea como materia prima en la producción de nonilfenoles etoxilados. Otras fuentes de contaminación de estos compuestos son las refinerías de petróleo y carbón, así como aguas residuales sometidas a tratamiento biológico donde los NPEO<sub>x</sub> se degradan parcialmente a compuestos más tóxicos y persistentes (NPEO<sub>1</sub>, NPEO<sub>2</sub>, NP, 4-n-NP).

##### ***1.4.1. Estructura y propiedades físico – químicas del NP, 4-n-NP y los NPEO<sub>x</sub>.***

En la figura 1 se muestran las estructuras de la mezcla de isómeros del nonilfenol, el nonilfenol lineal y de sus derivados etoxilados. Con una estructura común de anillo fenólico con una cadena carbonada de nueve carbonos, el nonilfenol (NP) se compone de una mezcla de isómeros de cadena y posición siendo los de la posición *para*- los mayoritarios, aproximadamente el 90 % (Warhurst, 1995). El 4-n-NP presenta la misma estructura pero su cadena carbonada es lineal en la posición *para*- del anillo fenólico. Sus derivados etoxilados presentan una estructura similar, pero en lugar del grupo hidroxilo del anillo fenólico presentan grupos etoxi. Estos compuestos se nombran en función del número de unidades etoxi siendo por tanto el nonilfenol

monoetoxilado, el derivado con un único grupo etoxi, nonilfenol dietoxilado el derivado con dos grupos, y así sucesivamente.

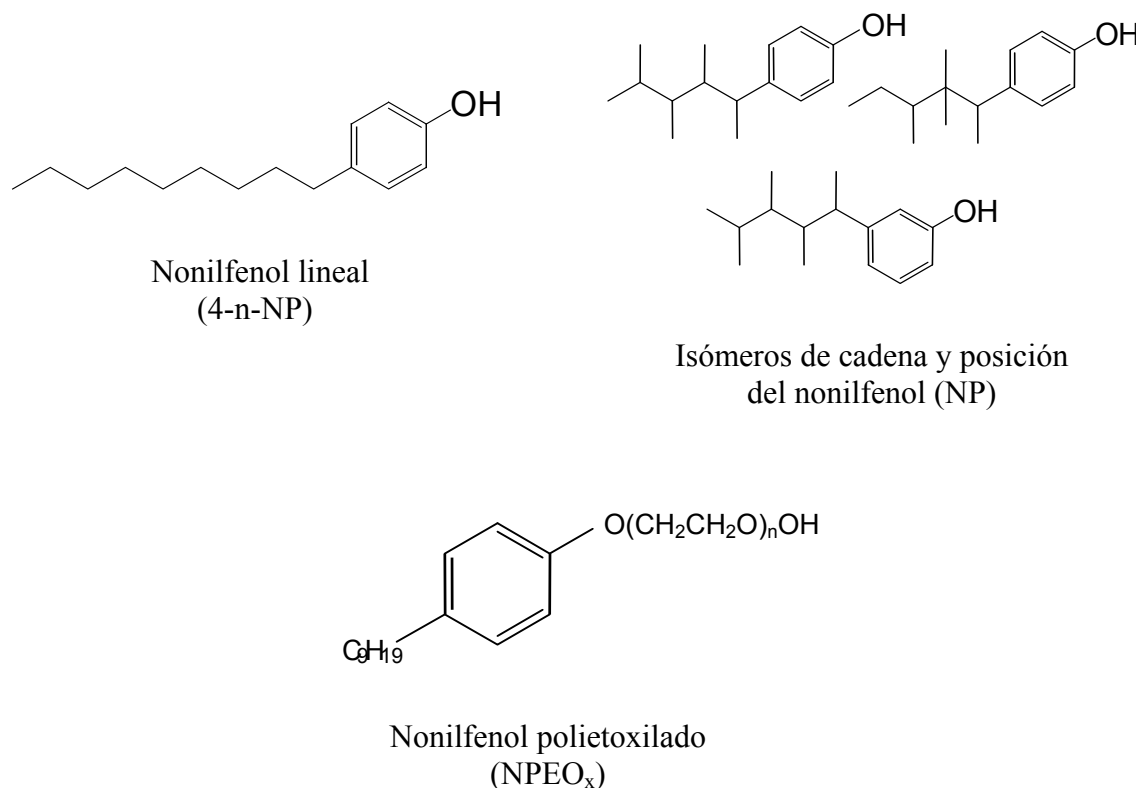


Figura 1. Estructura del 4-n-NP, NP y los NPEO<sub>x</sub>

Las propiedades físico-químicas más relevantes de las mezclas de isómeros de los nonilfenoles son: un peso molecular de 220 g mol<sup>-1</sup>, densidad de 0.953 g ml<sup>-1</sup> a 20°C; tienen una constante de disociación de 10.7±1.0 y un coeficiente de partición octanol/agua (log K<sub>ow</sub>) entre 3.8 y 4.8; su solubilidad en agua depende del pH y de la temperatura, mostrando un valor de 6.350 µg L<sup>-1</sup> a pH=5 y 25°C; son solubles en muchos disolventes orgánicos con una presión de vapor de 4.55 x 10<sup>-3</sup> Pa; su coeficiente de adsorción (K<sub>d</sub>) varía en función del tipo de matriz, para suelos de uso agrícola su valor varía entre 8.5 y 321.8 (Düring y col., 2002), mientras que en partículas en suspensión presentes a la entrada de las plantas de tratamiento de aguas puede ser superior a 1900 l kg<sup>-1</sup> (Vázquez-Duhalt y col., 2005). Dado que presentan una constante de adsorción relativamente alta, la movilidad del NP es baja (Jacobsen y col., 2004; Düring y col., 2002), lo que conlleva una fuerte adsorción a los suelos. Este hecho se

hace más evidente en los NPEO<sub>x</sub>, los cuales presentan constantes de adsorción más elevadas, para sedimentos entre 450-1460 l kg<sup>-1</sup> o en lodos 12000-13000 l kg<sup>-1</sup>. Los valores van disminuyendo al aumentar el número de grupos etoxi, ya que los compuestos se vuelven más hidrofílicos (John y col., 2000; Clara y col., 2007). Estos parámetros son la base de su toxicidad y bioacumulación en el medio ambiente. Las propiedades del 4-n-NP son similares a las de la mezcla de isómeros.

#### 1.4.2. Fuentes y usos.

El nonilfenol se produce como producto de reacción del propileno en el refinamiento del petróleo y del carbón. Esta reacción se encuentra representada en la figura 2. En primer lugar se produce la oligomerización y separación de los trímeros y tetrámeros de propileno. El trímero de propileno reacciona con el fenol en presencia de una resina catalizadora de intercambio iónico ácida para dar nonilfenol, el cual es destilado obteniéndose como resultado una mezcla de nonilfenoles, predominantemente p-sustituidos.

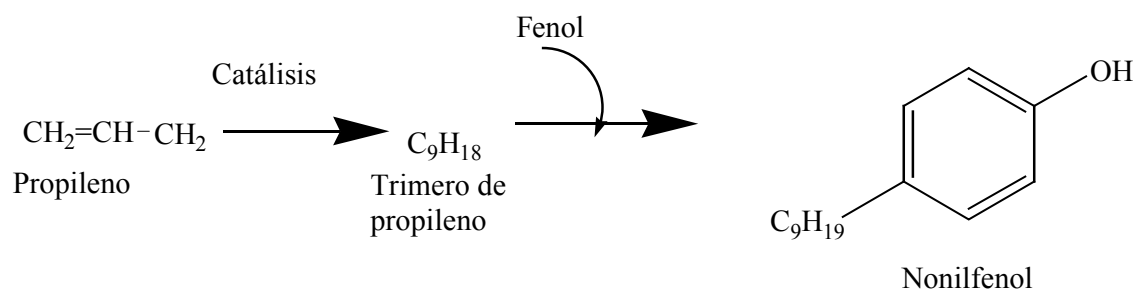


Figura 2. Formación de NP (Vázquez-Duhalt y col., 2005).

En la tabla 2 se recoge un listado de los campos de aplicación del nonilfenol y sus derivados. De todas las aplicaciones descritas en esta tabla la más importante es la de la industria de los detergentes que supone el 80% de la demanda actual, como se recoge en la figura 3.

Tabla 2. Usos del NP y NPEOx (Vázquez-Duhalt y col, 2005).

<i>Surfactantes</i>	Los nonilfenoles se utilizan como materia prima en la fabricación de los nonilfenoles polietoxilados, empleados como surfactantes.
<i>Antioxidantes</i>	Síntesis del trisnonilfenol fosfito (TNPP) por reacción del NP con el tricloruro de fosforo.
<i>Resinas fenólicas y resinas epoxi.</i>	Síntesis de resinas fenólicas por reacción del NP y otros alquilfenoles con aldehidos. En algunas ocasiones se emplean también en la fabricación de resinas epoxi.
<i>PVC</i>	Muchos derivados del NP se emplean como productos intermedios de reacción en la síntesis de plastificantes.
<i>Química del caucho</i>	El sulfato de nonilfenol se emplea en tratamientos de recuperación de gomas sintéticas.
<i>Varios</i>	Inhibidores de corrosión, fármacos, estabilizadores químicos, industria de la piel.

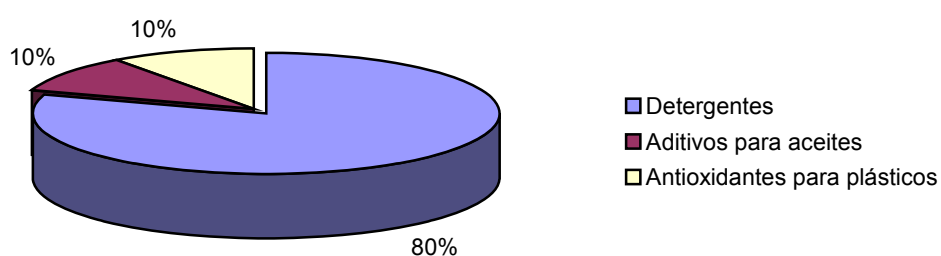


Figura 3. Usos de los nonilfenoles y sus derivados etoxilados.

### 1.4.3. Presencia y evolución del Nonilfenol y sus derivados etoxilados en el medio ambiente.

Como se ha visto anteriormente los nonilfenoles etoxilados se emplean fundamentalmente como detergentes, por lo que pueden ser liberados al medio ambiente a través de las descargas de aguas residuales industriales y domésticas además de como efluentes de plantas de tratamiento. Tanto los nonilfenoles como sus derivados etoxilados se adsorben con facilidad en matrices sólidas como sedimentos, lodos y suelos, por lo que la contaminación de suelos agrícolas en los que utilicen los lodos como fertilizantes es muy probable.

En la figura 4 se recoge un pequeño esquema donde se describen las posibles rutas de contaminación ambiental por nonilfenoles.

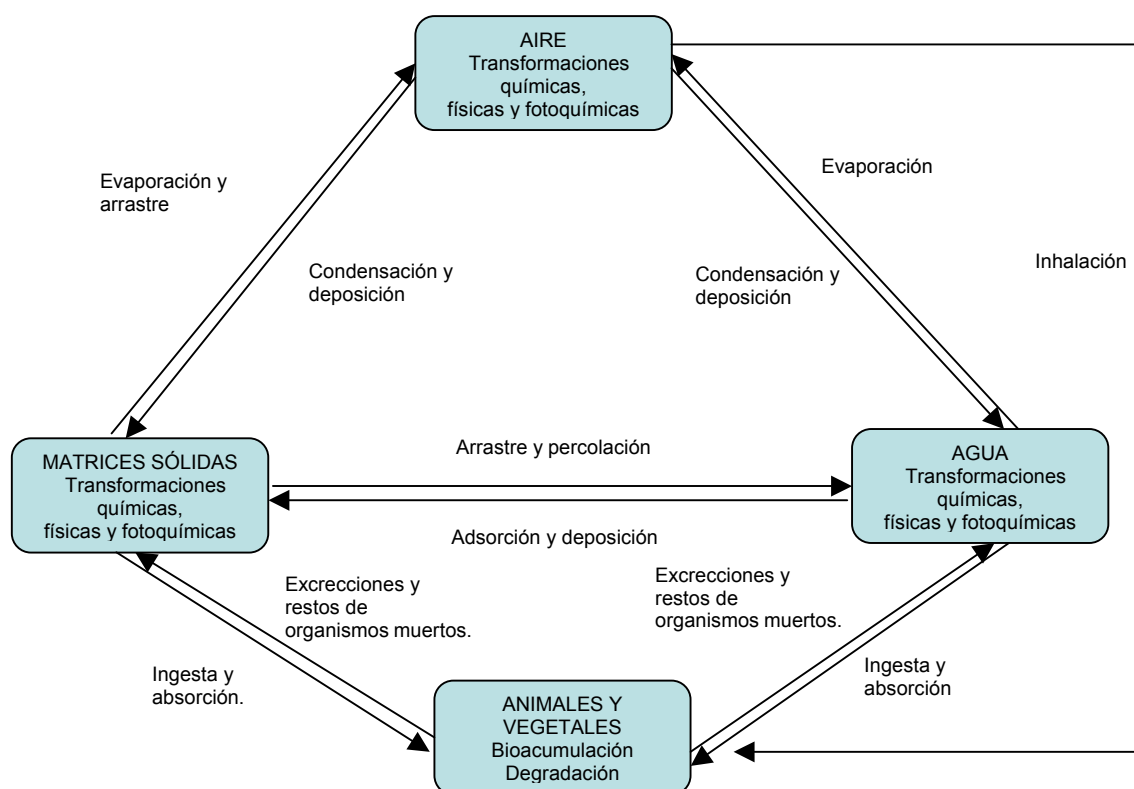


Figura 4. Rutas de contaminación ambiental por nonilfenoles

Los nonilfenoles etoxilados de cadena larga son transformados por microorganismos en el medio ambiente para formar compuestos más tóxicos como son la mezcla de isómeros del nonilfenol (NP), nonilfenol lineal (4-n-NP) y los nonilfenoles etoxilados de cadena corta (NPEO<sub>n</sub> n = 1-2). El nonilfenol a su vez también se puede degradar fotoquímicamente en el agua, siendo la velocidad de su degradación dependiente de la profundidad a la que se encuentre. Esta fotodegradación también tiene lugar en los derivados etoxilados pero a una velocidad mucho menor que la del NP, y no es significativa desde el punto de vista ambiental (Ahel y col., 1994). Posiblemente la degradación que presente una mayor importancia es la que se produce en las plantas de tratamiento de aguas residuales. En ella se dan condiciones fundamentalmente anaeróbicas en las que, al igual que en la degradación por microorganismos, los surfactantes etoxilados dan lugar a nonilfenol y sus derivados etoxilados de cadena corta. Es por ello que es posible encontrar concentraciones muy altas de los alteradores endocrinos más tóxicos en los lodos finales procedentes de depuradoras.

En la figura 5 se muestran las distintas vías de degradación de los NPEO<sub>x</sub>. El proceso de degradación comienza con la fragmentación de las unidades de grupos etoxi, generando nonilfenoles mono y di-etoxilados. La completa detoxilación únicamente se obtiene en condiciones anaeróbicas. Por otro lado la oxidación de los grupos etoxi genera ácido fenoxiacético. Los compuestos más comunes que se producen en la degradación de los nonilfenoles polietoxilados son: nonilfenoles (isómeros y lineal), nonilfenoles polietoxilados de cadena corta y nonilfenoles carboxilados (Vázquez-Duhalt y col., 2005).

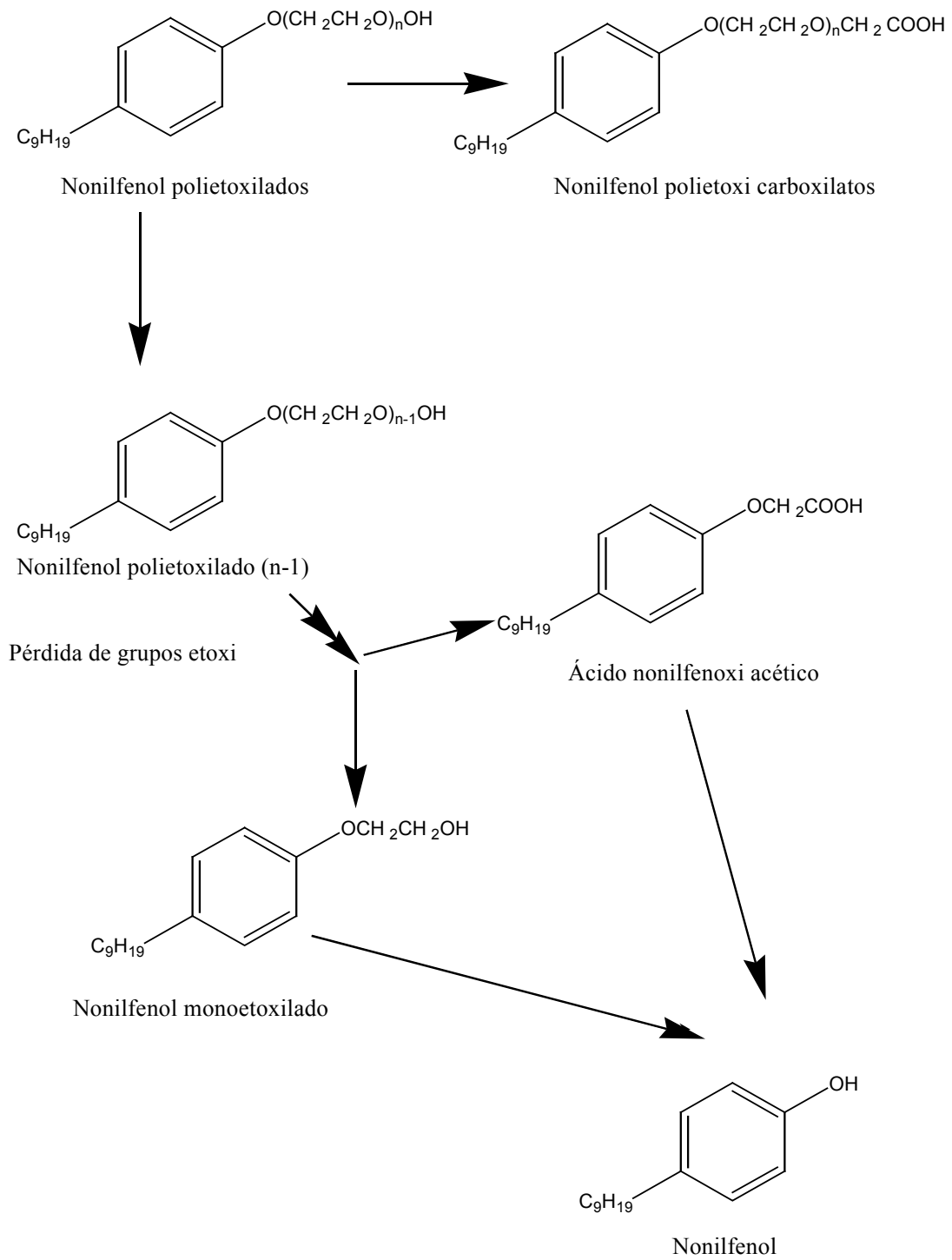


Figura 5. Degradación de los NPEOx.

Actualmente el destino final de la mayoría de estos lodos suele ser la incineración, la agricultura o los vertederos (Fig. 6) (Aparicio y col., 2009). Su uso en agricultura como fertilizante o enmienda del suelo puede provocar la contaminación no sólo del suelo sino también de los cultivos, organismos y aguas subterráneas por lixiviación o de aguas superficiales por escorrentía.

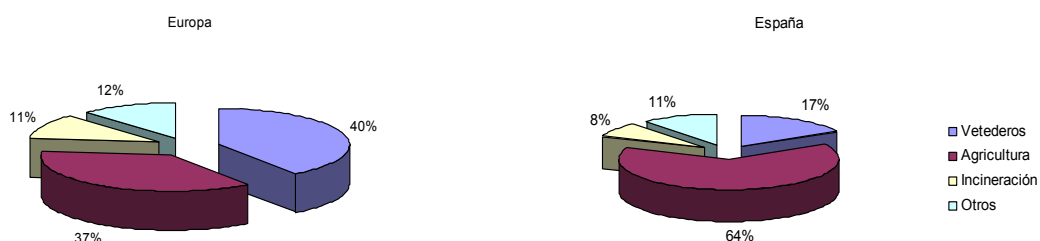


Figura 6. Destino final de los lodos procedentes de plantas de tratamiento de aguas.

La concentración de nonilfenol en los efluentes finales de las plantas de tratamiento es un indicativo de la eficacia de la misma. El nonilfenol es más abundante en estos efluentes que sus derivados etoxilados encontrándose en concentraciones superiores a  $12 \mu\text{g l}^{-1}$  cuando a la entrada se encontraban en concentraciones de  $82 \mu\text{g l}^{-1}$  (Petrovic y col., 2001). Las concentraciones más elevadas se encuentran en los lodos procedentes de depuradoras, superiores en algunos casos a  $1000 \text{ mg kg}^{-1}$  para el NP (Pryor y col., 2002). También es importante su presencia en sedimentos con concentraciones que varían de 1 a  $2000 \mu\text{g kg}^{-1}$  (González y col., 2004; Bartolomé y col., 2005).

Aunque estos compuestos presentan una baja volatilidad, especialmente los nonilfenoles polietoxilados, se han encontrado concentraciones de los mismos en aire urbano, lo que sugiere una posible transferencia de los mismos desde el agua o desde suelos contaminados (Dachs y col., 1999; Rudel y col., 2009).

En la tabla 3 se recoge un resumen de las concentraciones máximas encontradas en el medio ambiente en distintas zonas geográficas.

Tabla 3. Concentraciones de NP, 4-n-NP y NPEO<sub>x</sub> encontradas en el medio ambiente.

Compuesto	Matriz	Localización	Concentraciones	Ref.
NPEO <sub>x</sub> x ~ 10	Aguas residuales	Suiza	430 µg l <sup>-1</sup>	Ahel y col., 2000
NP NPEO <sub>x</sub> x ~ 10	Aguas residuales	Barcelona, España	82 µg l <sup>-1</sup> 1850 µg l <sup>-1</sup>	Petrovic y col., 2001
NPEO <sub>6-15</sub>	Aguas residuales	Dinamarca	25.1 µg l <sup>-1</sup>	Cohen y col., 2001
NPEO <sub>1</sub> NPEO <sub>2</sub> NPEO <sub>x</sub> (3≤x≤15)	Aguas residuales	Cataluña, España	125 µg l <sup>-1</sup> 33 µg l <sup>-1</sup> 190 µg l <sup>-1</sup>	González y col., 2004
4-n-NP NPEO <sub>1</sub> NPEO <sub>2</sub>	Partículas en suspensión	Grecia	2.17 µg g <sup>-1</sup> 11.1 µg g <sup>-1</sup> 11.1 µg g <sup>-1</sup>	Gatidou y col., 2007
NP NPEO <sub>1</sub>	Sedimentos	Nueva York, Estados Unidos	4.1 µg g <sup>-1</sup> 7.3 µg g <sup>-1</sup>	Lee Ferguson y col., 2001
NP NPEO <sub>x</sub> (x=9-10)	Sedimentos	Italia	4.7 µg g <sup>-1</sup> 11.2 µg g <sup>-1</sup>	Valsecchi y col., 2001
NP NPEO <sub>1</sub> NPEO <sub>2</sub>	Sedimentos	Cataluña, España	1.7 µg g <sup>-1</sup> 0.7 µg g <sup>-1</sup> 0.4 µg g <sup>-1</sup>	Gonzalez y col., 2004
NP NPEO <sub>1+2</sub>	Sedimentos	Bilbao, España	1.1 µg g <sup>-1</sup> 1.5 µg g <sup>-1</sup>	Bartolomé y col., 2005
NP	Sedimentos	Irlanda	1.57 µg g <sup>-1</sup>	Reid y col., 2009
NP NPEO <sub>1</sub> NPEO <sub>2</sub>	Sedimentos	Danubio	2.83 µg g <sup>-1</sup> 2.10 µg g <sup>-1</sup> 0.28 µg g <sup>-1</sup>	Micic y col., 2009
NP NPEO <sub>2</sub>	Suelos	Dinamarca	2.4 µg g <sup>-1</sup> 2.2 µg g <sup>-1</sup>	Vikelsee y col., 2002

Tabla 3. Concentraciones de NP, 4-n-NP y NPEO<sub>x</sub> encontradas en el medio ambiente (continuación).

Compuesto	Matriz	Localización	Concentraciones	Ref.
NP NPEO <sub>1</sub> NPEO <sub>2</sub>	Sedimentos	Danubio	2.83 µg g <sup>-1</sup> 2.10 µg g <sup>-1</sup> 0.28 µg g <sup>-1</sup>	Micic y col., 2009
NP NPEO <sub>2</sub>	Suelos	Dinamarca	2.4 µg g <sup>-1</sup> 2.2 µg g <sup>-1</sup>	Vikelsee y col., 2002
NP	Suelos	Reino Unido	4.4 µg g <sup>-1</sup>	Gibson y col., 2005
NPEO <sub>x</sub>	Lodos	Dinamarca	43.6 µg g <sup>-1</sup>	Cohen y col., 2001
NP NPEO <sub>x</sub> x ~ 10	Lodos	Barcelona	172 µg g <sup>-1</sup> 135 µg g <sup>-1</sup>	Petrovic y col., 2001
NP	Lodos	Nueva York, Estados Unidos	1840 µg g <sup>-1</sup>	Pryor y col., 2002
NP NPEO <sub>1-2</sub>	Lodos	Grecia	93 µg g <sup>-1</sup> 233 µg g <sup>-1</sup>	Fountoulakis y col., 2005
4-n-NP	Lodos	Grecia	0.45 µg g <sup>-1</sup>	Stasinakis y col., 2008
NP	Lodos	Irlanda	22.8 µg g <sup>-1</sup>	Reid y col., 2009
NP NPEO <sub>1</sub> NPEO <sub>2</sub>	Lodos	Andalucía, España	131 µg g <sup>-1</sup> 36 µg g <sup>-1</sup> 16 µg g <sup>-1</sup>	Aparicio y col., 2009
NP	Aire exterior	Varios orígenes	100 ng m <sup>-3</sup>	Rudel y col., 2009
NP	Aire exterior	Nueva York, Estados Unidos	2.2–70 ng m <sup>-3</sup>	Dachs y col., 1999

#### 1.4.4. Toxicidad.

La toxicidad de estos compuestos reside en su capacidad para mimetizar el comportamiento de los estrógenos naturales y provocar alteraciones en el sistema endocrino de los organismos. El nonilfenol interacciona uniéndose como un estrógeno por sus similitudes estructurales en el anillo fenólico. Un ejemplo de estas similitudes se da con el 17- $\beta$ -estradiol, estrógeno sintetizado de forma natural y que actúa sobre el desarrollo, mantenimiento y funciones de los órganos reproductores femeninos, los ciclos de actividad sexual y las características sexuales secundarias femeninas. Asimismo, actúa sobre el sistema cardiovascular y sobre el mecanismo de coagulación de la sangre, favoreciendo una disminución en el tiempo de coagulación y un aumento del número de plaquetas. En la figura 7 se observa la similitud entre NP y 17- $\beta$ -estradiol.

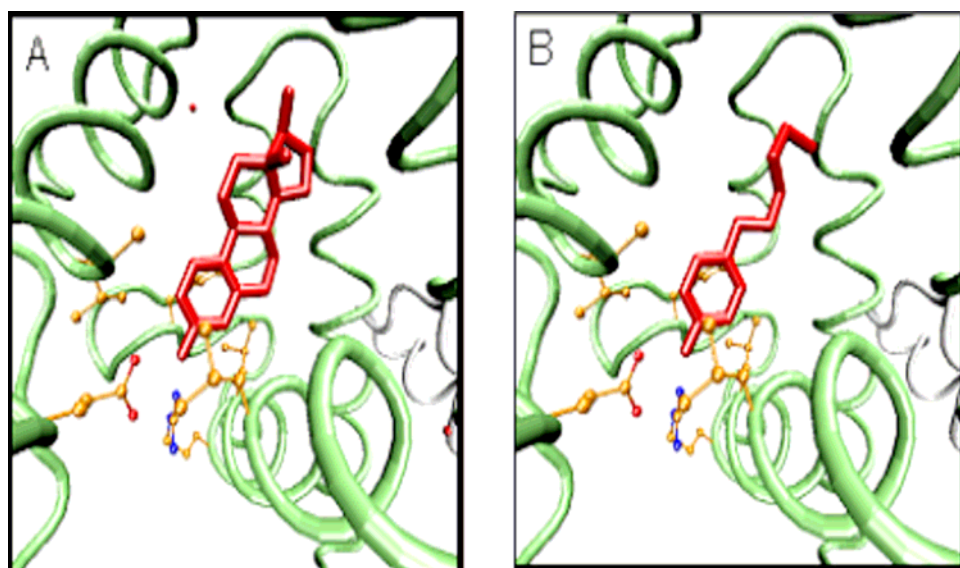


Figura 7. A: 17- $\beta$ -Estradiol; B: nonilfenol como ligandos para el estrógeno receptor (Vázquez-Duhalt y col., 2005).

Mueller y su grupo en 1978 dieron los primeros indicios de la actividad del nonilfenol como alterador endocrino (Mueller y col., 1978), siendo este hecho posteriormente confirmado por Soto y col. (1991). Desde entonces se han publicado numerosos estudios que muestran la toxicidad del NP en distintos organismos. Un ejemplo característico es el caso de las lombrices, que después de 196 días de exposición al NP mostraron disminución en el crecimiento y en el número de puesta de huevos (Widarto y col., 2004). También existen estudios en los que se demuestra el efecto del NP en hongos provocando un aumento en la producción de esporas aunque, en general, los efectos negativos sobre estos organismos son bastante bajos (Sumpter y col., 1998). Por otro lado se ha demostrado que el impacto que tienen los alteradores endocrinos sobre organismos acuáticos versa principalmente sobre una afeminación en peces a concentraciones de nonilfenol entre 17 y 3000  $\mu\text{gL}^{-1}$ . Los invertebrados son también sensibles al nonilfenol en el rango de 21-3000  $\mu\text{gL}^{-1}$ , y en algas el  $\text{LC}_{50}$  se encuentra entre 27-2500  $\mu\text{gL}^{-1}$ . Los efectos en mamíferos incluyen la disminución en el aumento de peso y hemorragias en el hígado. En diferentes especies acuáticas se han observado factores de concentración por acumulación que varían entre 100 y 3400 veces. Por tanto, los nonilfenoles sufren biomagnificación a través de la cadena trófica, aunque este proceso puede reducirse gracias a la capacidad metabólica de los organismos.

Otros estudios muestran que el NP tiene un efecto directo en la activación del estrógeno receptor alfa, el cual induce a la proliferación de células cancerígenas en el pecho (Recchia y col., 2004). En cuanto al 4-n-NP, estudios realizados sobre el crecimiento en distintas plantas muestran que la presencia de este compuesto afecta a especies como la remolacha a concentraciones entre 10-50  $\times 10^{-3}\text{mmol l}^{-1}$ , produciendo la muerte de todos los individuos en estudio a concentraciones superiores. Sin embargo otras especies como la zanahoria y la soja presentan una menor sensibilidad, ya que a concentraciones de 1000  $\times 10^{-3}\text{mmol l}^{-1}$  no se observa efecto alguno (Bokern y col., 1997). Por lo tanto y aunque los efectos positivos del uso de lodos en suelos agrícolas están documentados, existen algunos riesgos asociados a esta práctica que se encuentran todavía en estudio (Petersen y col., 2003).

En la tabla 4 se recoge un resumen de los efectos que tienen el NP y algunos de sus derivados etoxilados sobre distintas especies.

Tabla 4. Efectos tóxicos de NP y NPEOx. Unidades en  $\mu\text{g l}^{-1}$  (Staples y col., 2004).

Compuesto	Especies	Condiciones del test	NOEC	LOEC
NPEO <sub>9</sub>	<i>Pimephales promelas</i> .	Adicionando concentraciones de 0, 0.21, 0.65, 2.1, 7.9 $\mu\text{g/L}$ a 3 machos y 3 hembras durante 42 días.	Mortalidad: 7.9 $\mu\text{g l}^{-1}$ Fecundidad: 7.9 $\mu\text{g l}^{-1}$	
NPEO <sub>2</sub> NP	Trucha arco iris <i>O. mykiss</i>	Adición durante 21 días de 30 $\mu\text{g/L}$ de ambos compuestos en peces de 2 años de edad.	Reducción del tamaño de los testículos. NPEO <sub>2</sub> : - NP: -	Reducción del tamaño de los testículos. NPEO <sub>2</sub> : 38.3 $\mu\text{g l}^{-1}$ NP: 36.8 $\mu\text{g l}^{-1}$
NPEO <sub>9</sub> NPEO <sub>4</sub> NPEO <sub>1</sub> NP	Medaka japonés <i>Oryzias latipes</i>	100 días: concentraciones; NPEO <sub>9</sub> : 30 a 1000 $\mu\text{g/L}$ NPEO <sub>4</sub> : 10 a 1000 $\mu\text{g/L}$ NPEO <sub>1</sub> : 10 a 300 $\mu\text{g/L}$ NP: 1 a 100 $\mu\text{g/L}$ .	Desarrollo sexual. NPEO <sub>9</sub> : 1000 $\mu\text{g l}^{-1}$ NPEO <sub>4</sub> : 1000 $\mu\text{g l}^{-1}$ NPEO <sub>1</sub> : 300 $\mu\text{g l}^{-1}$ NP: 100 $\mu\text{g l}^{-1}$	
NP	Pulga de agua <i>D. magna</i>	Exposición durante 21 días, método ASTM, concentraciones de 0, 44.3, 63.1, 116, 215, 500 $\mu\text{g/L}$ .	Mortalidad: 215 $\mu\text{g l}^{-1}$ Crecimiento: 116 $\mu\text{g l}^{-1}$	Mortalidad: 500 $\mu\text{g l}^{-1}$ Crecimiento: 215 $\mu\text{g l}^{-1}$
NP	Alga verde <i>S. Capricornutum</i>	96h, métodos ASTM y EPA, concentraciones: 0, 26.6, 66.7, 136, 329, 694, 1480, 2720 $\mu\text{g/L}$	Crecimiento: 694 $\mu\text{g l}^{-1}$	Crecimiento: 1480 $\mu\text{g l}^{-1}$
NP	Lenteja de agua. <i>L. minor</i> .	96 horas; métodos ASTM y EPA, concentraciones de 0, 88.0, 109, 375, 901, 2080 $\mu\text{g/L}$ .	Producción de fronda: 901 $\mu\text{g l}^{-1}$	Producción de fronda: 2080 $\mu\text{g l}^{-1}$

ASTM: American Society Testing Method, EPA: Environmental Protection Agency, NOEC: concentraciones sin efectos observados, LOEC: mínima concentración en la que se observan efectos.

En la actualidad se están empezando a utilizar alcoholes etoxilados en lugar de los nonilfenoles polietoxilados cuya formula general es  $R-(CH_2CH_2O)_xH$ , donde R es normalmente  $C_{9-16}$ , con el fin de minimizar los efectos tóxicos mencionados anteriormente. Estos compuestos presentan propiedades similares a los nonilfenoles polietoxilados, los procesos de eliminación en las plantas de tratamiento de aguas no suponen importantes cambios pero sus productos de degradación son menos tóxicos (Toxicology Environmental Consulting Ltd., 2002).

#### **1.4.5. Legislación.**

Actualmente existe una directiva, European Directive 2003/53/EC (Directiva 2003/53/EC, 2003), relativa a las restricciones sobre la comercialización, uso y preparación de ciertas sustancias peligrosas, incluyendo el NP y NPEOx. También el Working Document on Sludge 3<sup>rd</sup> Draft of the European Union aconseja una concentración límite de  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  de NP y NPEOx en lodos (Working Document on Sludge, 2000). Por otra parte, algunos países como Dinamarca y Suiza tienen legislación propia sobre la concentración de NP y NPEOx en lodos procedentes de depuradoras para su empleo en suelos agrícolas, siendo el valor límite permitido para Dinamarca de  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  y de  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  para Suiza (European Commission, 2001). Sin embargo, no todos los países tienen valores límites, razón por la cual es posible encontrar altas concentraciones de estos contaminantes orgánicos en sedimentos, suelos, aguas, lodos, etc. e incluso existen algunos estudios en los cuales se muestra la presencia de NP en alimentos (Guenther y col., 2002).

En Estados Unidos, está aprobado el uso de NP en adhesivos utilizados para el empaquetado y transporte, y también está permitido su uso como materia prima en la fabricación de papel, manufacturación de resinas y compuestos poliméricos. Todos ellos se emplean para empaquetar alimentos debiendo cumplir las condiciones marcadas en 21 CFR parte 175.300 (21 CFR, FDA).

## **1.5. Parabenos.**

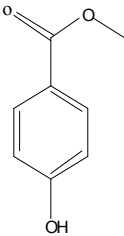
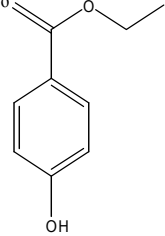
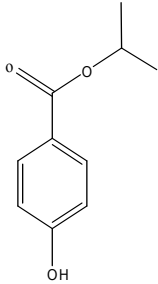
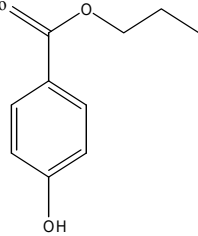
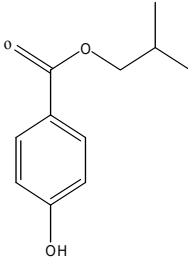
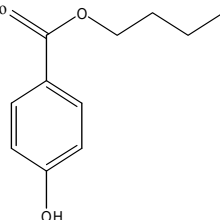
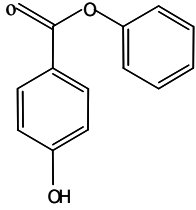
Los parabenos son compuestos que se utilizan fundamentalmente como bactericidas y conservantes en productos de cuidado personal y fármacos. Se utilizan fundamentalmente siete compuestos, metil, etil, isopropil, propil, isobutil, butil y bencilparabeno, todos ellos ésteres del ácido p-hidroxibenzoico. En estudios realizados en Estados Unidos se pudo constatar que de un total de 22228 productos, el metilparabeno estaba presente en 7866, el etilparabeno en 2310, el propilparabeno en 6260 y el butilparabeno en 2784 (Lundov y col., 2009). Hasta el momento estos compuestos no han sido objeto de estudios exhaustivos ya que en un principio como el resto de los contaminantes emergentes, se consideraban inocuos. Sin embargo, investigaciones recientes han comprobado la presencia de altas concentraciones de estos compuestos en tejidos tumorales así como una cierta actividad como alteradores endocrinos, razón por la cual su estudio ha empezado a tener un mayor interés.

### ***1.5.1. Estructura y propiedades físico-químicas.***

Los parabenos son compuestos formados por un anillo fenólico con un grupo ester en posición 4, cuya ramificación da el nombre a los distintos miembros de la familia. En la tabla 5 se recogen las estructuras y algunas propiedades de estos compuestos.

Por lo general, cuando se emplean estos compuestos como antimicrobianos, no suelen utilizarse de forma individual sino que en las formulaciones cosméticas suelen aparecer mezclas de los mismos para modificar su solubilidad y potenciar su acción. De forma separada sus propiedades como antimicrobianos aumentan con el número de carbonos presentes en la cadena alquílica, sin embargo la solubilidad disminuye, razón por la cual se utilizan también habitualmente junto a sales de sodio o formando complejos con ciclodextrinas (Giordano y col., 1999).

Tabla 5. Características físicas y químicas de los parabenos.

Compuestos	<i>MeP</i>	<i>EtP</i>	<i>iPrP</i>	<i>PrP</i>	<i>iBuP</i>	<i>BuP</i>	<i>BzP</i>
<b>Estructura</b>							
<b>N° CAS</b>	99-76-4	120-47-8	4191-73-5	94-13-3	4247-02-3	94-26-8	94-18-8
<b>Peso Molecular</b>	152.2	166.2	180.2	180.2	194.5	194.5	228.25
<b>Pka</b>	8.47	8.50		8.47		8.47	
<b>Log K<sub>ow</sub></b>	1.91	2.34		2.84	3.4	3.50	3.56

**1.5.2. Fuentes y Usos.**

Como se ha mencionado anteriormente, los parabenos son conservantes y antimicrobianos que se utilizan en un gran número de productos de cuidado personal, en fármacos, en alimentos y en bebidas. Proceden de la esterificación de ácido p-hidroxibenzoico y su actividad principal es contra el moho y bacterias gram-positiva. Normalmente se utilizan junto a otros compuestos que actúan contra bacterias gram-negativas (Cashman y col, 2005). En la tabla 6 se recogen algunos de los principales usos de los parabenos.

Tabla 6. Principales usos de los parabenos.

Uso	Comentario
Productos de cuidado personal	Posiblemente sea el uso más generalizado de estos compuestos. Geles de baño, champús, cremas dermatológicas, vendajes, cremas solares, etc. En la mayoría de los casos se emplean mezclas de estos conservantes.
Bebidas y comidas	En conservación de alimentos se utilizan desde 1930, para la protección de productos cárnicos (especialmente aquellos tratados con calor), conservas vegetales, repostería y salsas de mesa.
Fármacos	Los parabenos han sido utilizados en diferentes preparados farmacéuticos, tales como cremas de uso tópico o en recubrimiento en pastillas.

### ***1.5.3. Presencia y evolución de la familia de los parabenos en el medio ambiente.***

Dados los múltiples usos que se han comentado anteriormente, los parabenos, al igual que los nonilfenoles, pueden ser fácilmente liberados al medio ambiente a través de las aguas residuales, tanto industriales como domésticas que pueden ser utilizadas como aguas de regadío y por tanto acumularse en acuíferos, suelos, sedimentos y lodos. Los parabenos son compuestos que podemos encontrar en prácticamente todas las cremas hidratantes, nutritivas y solares por lo que otra posible vía de contaminación en el medio ambiente es por liberalización directa al bañarse, lavar o nadar en aguas de río, lago o mar. Además al estar tan extendida su utilización también se ha demostrado su presencia en el polvo y el aire.

Aunque como se ha mencionado anteriormente el interés en estos compuestos es reciente, existen varios trabajos publicados en los que se ha constatado la presencia de parabenos en los distintos compartimentos medioambientales. Las concentraciones encontradas no son excesivamente altas, siempre del orden de las ppb y en algunos casos ppt. En la mayoría de los casos los análisis se realizan en muestras acuosas, siendo la bibliografía en lo referente a muestras sólidas y aire muy escasa. En las tablas 6, 7 y 8, se muestra un resumen de las concentraciones encontradas en las distintas muestras medioambientales de diferentes áreas geográficas. En la mayoría de los estudios, independientemente de la zona geográfica y como hemos comentado anteriormente, las concentraciones encontradas son muy bajas, pero los parabenos que se encuentran en una concentración más elevada son el metilparabeno y el propilparabeno, ya que se trata de los dos conservantes más utilizados al producir su uso conjunto efectos sinérgicos.

Tabla 7. Concentraciones de parabenos encontradas en distintas muestras medioambientales acuosas.

Compuesto	Matriz	Localización	Concentraciones	Ref.
MeP EtP PropP ButP	Agua Residual	España	n.c. 198.6 pg ml <sup>-1</sup> 2640 pg ml <sup>-1</sup> 344 pg ml <sup>-1</sup>	Regueiro y col., 2009
MeP EtP PropP ButP	Agua Residual	España	2.92 ng ml <sup>-1</sup> 0.21 ng ml <sup>-1</sup> 0.81 ng ml <sup>-1</sup> 0.086 ng ml <sup>-1</sup>	Canosa y col., 2006
MeP EtP PropP ButP	Agua Residual	Toronto, Canada	1.47 ng ml <sup>-1</sup> 0.27 ng ml <sup>-1</sup> 2.43 ng ml <sup>-1</sup> 0.26 ng ml <sup>-1</sup>	Lee y col., 2005
MeP EtP PropP	Agua procedente de WWTP	Bélgica	2.1 ng ml <sup>-1</sup> n.c. 3.1 ng ml <sup>-1</sup>	Benijts y col., 2004
MeP EtP PropP	Agua procedente de industria	Bélgica	3.9 ng ml <sup>-1</sup> n.c. 6.1 ng ml <sup>-1</sup>	Benijts y col., 2004
MeP EtP PropP BzP	Agua Residual	Suecia	0.3 ng ml <sup>-1</sup> 0.2 ng ml <sup>-1</sup> 0.3 ng ml <sup>-1</sup> 1 ng ml <sup>-1</sup>	Paxéus, 1995
MeP EtP PropP ButP BzP	Aguas residuales	Galicia, España	3.2 ng ml <sup>-1</sup> 0.2 ng ml <sup>-1</sup> 0.9 ng ml <sup>-1</sup> n.d. 0.6 ng ml <sup>-1</sup>	Blanco y col., 2009

n.c.: no cuantificado.

n.d.: no detectado.

Tabla 7. Concentraciones de parabenos encontradas en distintas muestras medioambientales acuosas (continuación).

Compuesto	Matriz	Localización	Concentraciones	Ref.
MeP EtP PropP ButP	Agua de desecho de hospital	España	2.4 ng ml <sup>-1</sup> 0.10 ng ml <sup>-1</sup> 1.22 ng ml <sup>-1</sup> 0.019 ng ml <sup>-1</sup>	Canosa y col., 2006
MeP EtP PropP	Agua de río	Bélgica	85.1 ng ml <sup>-1</sup> 53.8 ng ml <sup>-1</sup> 78.4 ng ml <sup>-1</sup>	Benijts y col., 2004
MeP EtP PropP ButP	Agua de río	España	n.c. n.c. 23.8 pg ml <sup>-1</sup> 54.1 pg ml <sup>-1</sup>	Regueiro y col., 2009
MeP EtP PropP ButP BzP	Agua de grifo	Galicia, España	0.04 ng ml <sup>-1</sup> n.c. <LOQ n.c. n.c.	Blanco y col., 2009
MeP EtP PropP ButP BzP	Agua de río	Galicia, España	0.04 ng ml <sup>-1</sup> <LOQ <LOQ <LOQ <LOQ	Blanco y col., 2009
MeP EtP PropP ButP	Agua de piscina	España	n.c. n.c. 32.3 pg ml <sup>-1</sup> 77.5 pg ml <sup>-1</sup>	Regueiro y col., 2009

n.c.: no cuantificado.

Tabla 8. Concentraciones de parabenos encontradas en distintas muestras medioambientales sólidas.

Compuesto	Matriz	Localización	Concentraciones	Ref.
MeP EtP PropP ButP	Polvo interior	Galicia, España	468 ng g <sup>-1</sup> 108 ng g <sup>-1</sup> 406 ng g <sup>-1</sup> 76 ng g <sup>-1</sup>	Canosa y col., 2007
MeP EtP ButP	Polvo	USA	8.24 μg g <sup>-1</sup> 2.18 μg g <sup>-1</sup> 3.92 μg g <sup>-1</sup>	Rudel y col., 2003
MeP PropP BzP	Lodos	Tarragona, España	202 ng g <sup>-1</sup> 10 ng g <sup>-1</sup> 5 ng g <sup>-1</sup>	Nieto y col., 2009

Tabla 9. Concentraciones de parabenos encontradas en aire.

Compuesto	Matriz	Localización	Concentraciones	Ref.
MeP EtP ButP	Aire	USA	2.9 ng m <sup>3</sup> 4.0 ng m <sup>3</sup> 3.2 ng m <sup>3</sup>	Rudel y col., 2003

#### 1.5.4. Toxicidad.

Como hemos citado con anterioridad el estudio de estos compuestos es reciente, por lo que muchas investigaciones sobre su toxicidad se encuentran todavía en fase inicial. Aún así, existen distintos estudios que muestran una cierta toxicidad de estos compuestos cuyos efectos se recogen a continuación.

*Alterador Endocrino.* Distintos estudios realizados in-vitro revelan una pequeña actividad estrogénica, como son una unión con estrógenos receptores, catálisis de la expresión genética y proliferación de las células cancerígenas MCF-7 (Darbre y col, 2002, 2003; Byford y col, 2002). Por otro lado, hay estudios realizados in-vivo con algunos miembros de la familia de los parabenos (butil, isobutil y bencilparabeno) que

muestran un incremento del tamaño del útero y efectos adversos en la reproducción masculina (Tavares y col., 2009). Pero a pesar de estos datos, su actividad endocrina es varios órdenes de magnitud inferior al estradiol y también inferior a la del nonilfenol, como se muestra en un trabajo publicado por R. Golden en 2005 (Golden, 2005). Los estudios *in vitro* comparan la cantidad de distintos parabenos que serían necesarios para producir un efecto similar al de un compuesto de referencia como es el estradiol, que muestra una alta actividad endocrina. Esta comparación (en relación molar) se hace en términos de unión competitiva al estrógeno receptor (ER), de regulación de la catálisis en la expresión genética y de la proliferación de las células MCF-7.

En la tabla 10, se recogen algunos de los resultados obtenidos en los estudios realizados *in vitro* por distintos grupos de investigación en las células MCF-7.

Tabla 10. Estudios in Vitro en las células MCF-7.

<b>Comparación con 17 <math>\beta</math>-estradiol (relación molar)</b>				
<b>Compuestos</b>	<b>Detección del ligando competitivo a el ER de las células MCF-7.</b>	<b>Regulación de la expresión genética en células MCF-7</b>	<b>Proliferación de las células MCF-7</b>	<b>Ref.</b>
<i>17 <math>\beta</math>-estradiol</i>	1	1	1	Byford y col., 2002
<i>Metilparabeno</i>	1.000.000	10.000	1.000.000	
<i>Etilparabeno</i>	1.000.000	10.000	1.000.000	Darbre y col., 2002 Darbre y col., 2003
<i>Propilparabeno</i>	100.000	10.000	100.000	
<i>Isobutilparabeno</i>	100.000	1000	100.000	Okubo y col., 2001
<i>Butilparabeno</i>	100.000	1000	100.000	
<i>Bencilparabeno</i>	1000	1000	100.000	

Como se observa en la tabla 10, estos compuestos presentan mucha menor actividad como alteradores endocrinos que el estradiol y esta afirmación se confirma

con los distintos estudios *in vivo* realizados en varios animales, diferenciando entre machos y hembras, ya que los efectos que tienen varían en función del sexo. Estos estudios *in vivo* demuestran que los parabenos de cadena más corta muestran una menor actividad como alteradores endocrinos y que son los de cadena larga o ramificada los más estrogénicos, si bien aún en varias órdenes de magnitud inferiores al estradiol. En la tabla 11 se recogen las dosis de los diferentes parabenos a partir de las cuales se producen efectos sobre el útero.

Tabla 11. Estudio de diversas concentraciones sobre el útero en ratas y ratones.

Compuesto	Efectos sobre el útero en ratas (administración:dosis)	Efectos sobre el útero en ratones (administración:dosis)	Ref.
Metilparabeno	No (Sc: 80 mg/kg/día) No (O:800mg/kg/día)	No (Sc:100mg/kg/día) No (O:1000mg/kg/día)	Routledge y col., 1998 Hossaini y col., 2000
Etilparabeno		No (Sc:100mg/kg/día) No (O:1000mg/kg/día)	Hossaini y col., 2000
Propilparabeno		No (Sc:100mg/kg/día) No (O:100mg/kg/día)	Hossaini y col., 2000
Butilparabeno	Si (Sc:600mg/kg/día) No (O:1200mg/kg/día)	No(Sc:100mg/kg/día)	Hossaini y col., 2000 Routledge y col., 1998
Bencilparabeno		Si (externo: 33mg/día)	Darbre y col., 2003
Isopropilparabeno	Sin datos	Sin datos	
Isobutilparabeno		Si(Sc:72 y 720 mg/kg/día)	Darbre y col., 2002

Sc: subcutáneo

O: oral

También se ha demostrado la influencia que pueden tener los parabenos sobre la infertilidad masculina. Aunque es un tema que se encuentra todavía en estudio, diversas investigaciones han demostrado que tanto el butilparabeno como el propilparabeno tienen efectos negativos en la síntesis de testosterona y en la actividad reproductiva masculina (Oishi, 2001, 2002). Sin embargo, los efectos del metil y del etilparabeno son los contrarios, confirmándose así, un orden de mayor a menor en términos de acción disruptora: isobutil > isopropil > bencil > butil > propil > etil > metilparabeno. De hecho, un estudio realizado en peces por Pedersen y col. muestra que el etilparabeno posee una actividad como alterador endocrino hasta seis veces menor que el propil y el butilparabeno (Pedersen y col., 2000).

Por otro lado, distintos estudios sugieren que la exposición a butilparabeno durante los periodos de gestación y lactancia tiene efectos negativos sobre el desarrollo de los órganos reproductivos masculinos. Además en distintos estudios realizados *in vivo* en ratas y ratones sometidos a distintas concentraciones de butil y propilparabeno, se ha confirmado que tanto el tamaño de los órganos como la movilidad y el número de espermatozoides se ve reducido (Oishi y col., 2001, 2002; Kang y col., 2002; Tavares y col., 2009). En la figura 8 aparece un esquema que resume los posibles efectos tóxicos que pueden tener los parabenos sobre la célula (Darbre y col., 2008).

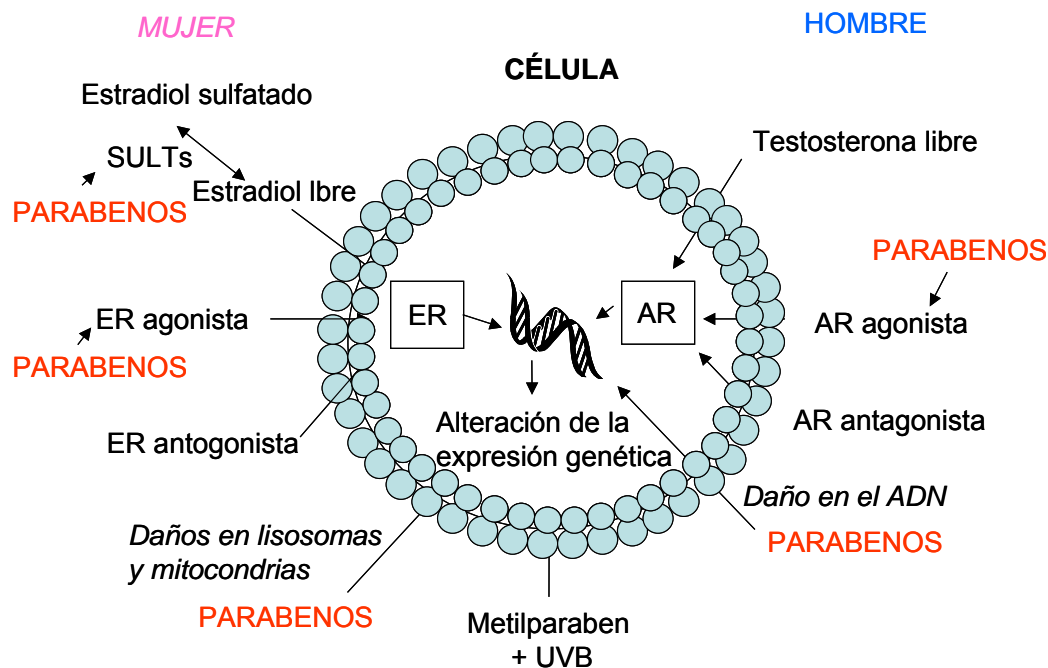


Figura 8. Esquema de los efectos tóxicos que pueden generar los parabenos en la célula (Darbre y col., 2008).

*Parabenos y cancer de mama.* Posiblemente uno de los estudios que más haya llamado la atención y aumentado la preocupación sea el desarrollado por Darbre y col en 2004. En este trabajo se observaron altas concentraciones de parabenos, concretamente 12.8 ng g<sup>-1</sup> de metilparabeno, 2.0 ng g<sup>-1</sup> de etilparabeno, 2.6 ng g<sup>-1</sup> de propilparabeno, 2.3 ng g<sup>-1</sup> de butilparabeno, y 0.9 ng g<sup>-1</sup> de isobutilparabeno en tumores de mama. Esto demostró que al menos una proporción de los parabenos presentes en cosméticos, alimentos y productos farmacéuticos es absorbida y retenida en tejidos humanos, aunque en este estudio no se identificó la fuente de los parabenos o si estos entran al cuerpo humano por vía oral o tópica.

*Dermatitis.* Existen una gran cantidad de estudios que describen casos de dermatitis en la piel como resultado del contacto con los parabenos presentes en distintos productos de aplicación tópica, como cremas, geles, pomadas, vendajes médicos, etc. En general la dermatitis de contacto suele tener una mayor incidencia en personas que presenten algún tipo de daño en la piel, ya que ésta se encuentra más sensible y la aplicación de cualquier producto que contenga parabenos puede desencadenar la dermatitis. Aún así, el porcentaje de incidencia de la dermatitis de contacto producida por parabenos es bastante baja, rondando en la mayoría de los estudios de 0 a 4.2 % (Cashman y col., 2005).

En cuanto a la ingestión de productos que contengan parabenos en su composición por parte de personas sensibles a los mismos, son pocos los casos que se conocen en los que se haya producido algún tipo de efecto. Veien y col. en 1996 realizaron un estudio en un grupo de 14 personas sensibles a los parabenos a las que se suministró un placebo y cápsulas con parabenos. Sólo dos individuos mostraron sensibilidad ante estos compuestos.

Gracias a la existencia de los distintos estudios que muestran la toxicidad de los parabenos, distintas casas comerciales de productos cosméticos como L'Oréal y Givaudan, ya han desarrollado patentes de productos libres de estos compuestos. (Thelme, L'Oréal; Natsch, Givaudan).

### ***1.5.5. Legislación.***

En 1976 la Unión Europea estableció la directiva 76/768/EC para homogenizar las leyes de los estados miembros en relación a los productos cosméticos. En el anexo II de la misma se recogen algunas sustancias que se encuentran prohibidas y otras que presentan una concentración máxima permitida. Éste es el caso de los parabenos, para los que se ha establecido una concentración máxima individual de 0.4% o bien no superior al 0.8% de la mezcla de ellos (Directiva 76/768/EC). Estas restricciones coinciden con las establecidas por Estados Unidos.

El Scientific Comité on Consumer Products (SCCP) de la Comisión Europea, es un comité independiente formado por científicos expertos en distintos campos que evalúan la composición de cosméticos y analizan sus posibles efectos tóxicos. En su última reunión realizada en junio del 2008 se pusieron en duda algunos de los estudios realizados sobre la toxicidad de estos compuestos, y se acordó la necesidad de realizar nuevos estudios para poder establecer con más seguridad dicha toxicidad (SCCP, 2008).

En Estados Unidos todos los conservantes para cosméticos son evaluados por Cosmetic Ingredient Review (Cosmetic Ingredient Review) integrado por miembros de la industria, de la FDA y de la federación de consumidores americanos. Tanto en USA como en la EU los fabricantes están obligados a incluir en cada producto en orden descendente de concentración todos los ingredientes utilizados, permitiendo de esta manera a los consumidores conocer los ingredientes contenidos a fin de evitar posibles reacciones alérgicas.

En cuanto a las concentraciones máximas permitidas en los distintos compartimentos medioambientales, no existe legislación al respecto, ya que se trata de compuestos cuyos efectos tóxicos en el medio ambiente y en los seres humanos se están empezando a investigar.

**1.6. Bibliografía.**

- Ahel, M.; Giger, W.; Schaffner, C.; *Water Research*, **1994**, *26*, 1143.
- Ahel, M.; Giger, W.; Molnar, E.; Ibric, S.; *Croatia Chemica Acta*, **2000**, *73*, 209.
- Aparicio, I.; Santos, J.L.; Alonso, E.; *Waste Management*, **2009**, *29*, 1747.
- Barceló, D.; *Trends in Analytical Chemistry*, **2003**, *22*, xiv.
- Barceló, D.; Petrovic, M.; *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2006**, 385, 983.
- Bartolomé, L.; Cortazar, E.; Raposo, J.C.; Usobiaga, A.; Zuloaga, O.; Etxebarria, N.; Fernández, L.A.; *Journal of Chromatography A*, **2005**, *1068*, 229.
- Befenati, E.; Barceló, D.; Jonson, I.; Galassi, S.; Levsen, K.; *Trends in Analytical Chemistry*, **2003**, *22*, 757.
- Benijts, T.; Lambert, W.; De Leenheer, A.; *Analytical Chemistry*, **2004**, *76*, 704.
- Blanco, E.; Casais, M.C.; Mejuto, M.C.; Cela, R.; *Analytica Chimica Acta*, **2009**, *647*, 104.
- Bokern, M.; Harms, H.H.; *Environmental Science and Technology*, **1997**, *31*, 1849.
- Byford, J.R.; Shaw, L.E.; Drew, M.G.; Pope, G.S.; Sauer, M.J.; Darbre, P.D.; *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **2002**, *80*, 49.
- Canosa, P.; Rodríguez, I.; Rubí, E.; Bollaín, M.H.; Cela, R.; *Journal of Chromatography A*, **2006**, *1124*, 3.
- Canosa, P.; Rodríguez, I.; Rubí, E.; Cela, R.; *Analytical Chemistry*, **2007**, *79*, 1675.
- Carson, R.L.; *Silent Spring*, **1962**, Houghton Mifflin, Boston.
- Cashman, A.L.; Warshaw, E.M.; *Dermatitis*, **2005**, *16*, 57.
- Clara, M.; Scharf, S.; Scheffknecht, C.; Gans, O.; *Water Research*, **2007**, *41*, 4339.
- Cohen, A.; Klint, K.; Bowadt, S.; Persson, P.; Jönsson, J.A.; *Journal of Chromatography A*, **2001**, *927*, 103.
- Colborn, T.; Dumanoski, D.; Myersen, P.; *Our Stolen Future*, **1996**, Penguin Books, New York.

- Cosmetic Ingredient Review, [http://www.cir-safety.org/staff\\_files/ReferenceTable.pdf](http://www.cir-safety.org/staff_files/ReferenceTable.pdf).
- Dachs, J.; Van Ry, D.A.; Eisenreich, S.J.; *Environmental Science and Technology*, **1999**, *33*, 2676.
- Darbre, P.D.; Byford, J.R.; Shaw, L.E.; Horton, R.A.; Pope, G.S.; Sauer, M.J.; *Journal of Applied Toxicology*, **2002**, *22*, 219.
- Darbre, P.D.; Byford, J.R.; Shaw, L.E.; Hall, S.; Coldham, N.G.; Pope, G.S.; Sauer, M.J.; *Journal of Applied Toxicology*, **2003**, *23*, 43.
- Darbre, P.D.; Aljarrah, A.; Miller, W.R.; Coldham, N.G.; Sauer, M.J.; Pope, G.S.; *Journal of Applied Toxicology*, **2004**, *24*, 5.
- Darbre, P.D.; Harvey, P.W.; *Journal of Applied Toxicology*, **2008**, *28*, 561.
- Directiva 76/768/EC, **1976**. Versión consolidada de la directiva: <http://ec.europa.eu/enterprise/cosmetics>.
- Directiva 2003/53/EC del Parlamento Europeo, junio **2003**.
- Düring, R.-A.; Krabe, S.; Gäth, S.; *Environmental Science and Technology*, **2002**, *36*, 4052.
- Eljarrat, E.; Barceló, D.; *Trends in Analytical Chemistry*, **2003**, *22*, 655.
- Estrategia comunitaria en Materia de alteradores endocrinos. Comisión de la Comunidades Europeas, Bruselas, **1999**.
- Estrategia comunitaria en materia de alteradores endocrinos. Comisión de la Comunidades Europeas, Bruselas, **2007**. [http://ec.europa.eu/environment/endocrine/documents/sec\\_2007\\_1635\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/environment/endocrine/documents/sec_2007_1635_en.pdf).
- European Commission, Joint Research Center, Organic Contaminants in Sewage Sludge for Agricultural use, **2001**, p. 73.
- Fountoulakis, M.; Drillia, P.; Pakou, C.; Kampioti, A.; Stamatelatou, K.; Lyberatos, G.; *Journal of Chromatography A*, **2005**, *1089*, 45.
- Gatidou, G.; Thomaidis, N.S.; Stasinakis, A.S.; Lekkas, T.D.; *Journal of Chromatography A*, **2007**, *1138*, 32.
- Gibson, R.; Wang, M.-J.; Padgett, E.; Beck, A.J.; *Chemosphere*, **2005**, *61*, 1336.
- Giordano, F.; Bettini, R.; Donini, C.; Gazzaniga, A.; Caira, M.R.; Zhang, G.G.Z.; Grant, D.J.W.; *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **1999**, *88*, 1210.
- Golden, R.; Gandy, J.; Vollmer, G.; *Critical Reviews in Toxicology*, **2005**, *35*, 435.

- González, S.; Petrovic, M.; Barceló, D.; *Journal of Chromatography A*, **2004**, *1052*, 111.
- Gunther, K.; Heinke, V.; Thiele, B.; Kleist, E.; Prast, H.; Raecker, T.; *Environmental Science and Technology*, **2002**, *36*, 1676.
- Hossaini, A.; Larsen, J.J.; Larsen, J.C.; *Food Chemistry and Toxicology*, **2000**, *38*, 319.
- Jacobsen, A.M.; Mortensen, G.K.; Hansen, C.B.; *Journal of Environmental Quality*, **2004**, *33*, 232.
- John, D.; Alan House, W.; White, G.F.; *Environmental Toxicology and Chemistry*, **2000**, *19*, 293.
- Kang, K.S.; Che, J.H.; Ryu, D.Y.; Kim, T.W.; Li, G.X.; Lee, Y.S.; *Journal of Veterinary Medical Science*, **2002**, *64*, 227.
- Lee, H.-B.; Peart, T.E.; Svoboda, M.L.; *Journal of Chromatography A*, **2005**, *1094*, 122.
- Lee Ferguson, P.; Iden, C.R.; Brownawell, B.J.; *Journal of Chromatography A*, **2001**, *938*, 79.
- Lundov, M.D.; Moesby, L, Zachariae, C.; Johansen, J.D.; *Contact Dermatitis*, **2009**, *60*, 70.
- Micic, V.; Hofmann, T.; *Environmental Pollution*, **2009**, *157*, 2759.
- Mueller, G.C.; Kim, U-H.; *Endocrinology*, **1978**, *102*, 1429.
- Natsch, A.; *Personal care product composition e.g. creams, salves, lotions, soaps, shampoos, balm, comprises benzaldehyde or benzaldehyde-derivative compound, fragrant acid and a cosmetically-acceptable base*, Patent number:WO2009000097-A2, Patent Assignee(s) and Codes(s):GIVAUDAN SA(GIVA-C).
- Nieto, A.; Borrull, F.; Marcé, R.M.; Pocurull, E.; *Journal of Chromatography A*, **2009**, *1216*, 5619.
- Oishi, S.; *Toxicology and Industrial Health*, **2001**, *17*, 31.
- Oishi, S.; *Food Chemistry and Toxicology*, **2002**, *40*, 1807.
- Okubo, T.; Yokoyama, Y.; Kano, K.; and Kano, I.; *Food and Chemical Toxicology*, **2001**, *39*, 1225.
- Paxéus, N.; *Water Research*, **1995**, *30*, 1115.

- Pedersen, K.L.; Pedersen, S.N.; Christiansen, L.B.; Korsgaard, B.; Bjerregaard, P.; *Pharmacology & Toxicology*, **2000**, *86*, 110.
- Petersen, S.O.; Henriksen, K.; Mortensen, G.K.; Krogh, P.H.; Brandt, K.K.; Sørensen, J.; Madsen, T.; Petersen, J.; Grøn, C.; *Soil & Tillage Research*, **2003**, *72*, 139.
- Petrovic, M.; Barceló, D.; *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2006**, *385*, 422.
- Petrovic, M.; Diaz, A.; Ventura, F.; Barceló, D.; *Analytical Chemistry*, **2001**, *73*, 5886.
- Petrovic, M.; Eljarrat, E.; De Alda, M.J.L.; *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2004**, *378*, 549.
- Pombo, M.; Castro, L.; Disruptores Endocrinos, Universidad de Santiago de Compostela. <http://www.asquifyde.org/wp-content/uploads/2009/07/disruptores-endocrinos-m-pombo-y-m-castro.pdf>.
- Pryor, S.W.; Hay, A.G.; Walter, L.P.; *Environmental Science and Technology*, **2002**, *36*, 3678.
- Recchia, A.G.; Vivacqua, A.; Gabriele, S.; Carpino, A.; Fasanella, G.; Rago, V.; Bonofiglio, D.; Maggiolini, *Food Additives and Contaminants*, **2004**, *21*, 134.
- Reid, A.M.; Brougham, C.A.; Fogarty, A.M.; Roche, J.J.; *Analytica Chimica Acta*, **2009**, *634*, 197.
- Regueiro, J.; Becerril, E.; García-Jares, C.; Llompert, M.; *Journal of Chromatography A*, **2009**, *1216*, 4693.
- Richardson, S.D.; *Analytical Chemistry*, **2009**, *81*, 4645.
- Routledge, E.J.; Parker, J.; Odum, J.; Ashby, J.; Sumpter, P.; *Toxicology and Applied Pharmacology*, **1998**, *153*, 12.
- Rudel, R.A.; Camann, D.E.; Spengler, J.D.; Korn, L.R.; Brody, J.G.; *Environmental Science & Technology*, **2003**, *37*, 4543.
- Rudel, R.A.; Perovich, L.J.; *Atmospheric Environment*, **2009**, *43*, 170.
- Scientific Committee on Consumer Products, SCCP, Opinion on Paraben, 2008.
- Soto, A.M.; Justicia, H.; Wray, J.W.; Sonnenschein, C.; *Environmental Health Perspectives*, **1991**, *92*, 167.
- Staples, C.; Mihaich, E.; Carbone, J.; Woodburn, K.; Klecka, G.; *Human and Ecological Risk Assessment*, **2004**, *10*, 999.

- Stasinakis, A.S.; Gatidou, G.; Mamais, D.; Thomaidis, N.S.; Lekkas, T.D.; *Water Research*, **2008**, 42, 1796.
- Sumpter, J.P.; *Toxicology Letters*, **1998**, 337, 102.
- Tavares, R.S.; Martins, F.C.; Oliveira, P.J.; Ramalho-Santos, J.; Peixoto, F.P.; *Reproductive Toxicology*, **2009**, 27, 1.
- Themens, A.; *Cosmetic composition in water-in-oil emulsion form, useful for make-up/care of keratinous fiber, preferably skin, comprises water, hydrocarbon surfactant, charge, and hydroxy compound comprising e.g. propylene glycol*, Patent number FR2917609-A1, Patent Assignee(s) and Codes(s):L'OREAL SA(OREA-C)
- Toxicology Environmental Consulting Ltd. Alternatives to Nonylphenol Ethoxylates: Review of Toxicity, Biodegradation & Technical-Economic Aspects. Prepared for Environment Canada, **2002**.
- Valsecchi, S.; Polesello, S.; Cavalli, S.; *Journal of Chromatography A*, **2001**, 925, 297.
- Vazquez-Duhalt, R.; Maquez-Rocha, F.; Ponce, E.; Licea, A.F.; Viana, M.T.; *Applied Ecology and Environmental Research*, **2005**, 4, 1.
- Veien, N.K.; Hattel, T.; Laurberg, G.; *Contact Dermatitis*; **1996**, 34, 433.
- Vikelseo, J.; Thomsen, M.; Carlsen, L.; *The Science of the Total Environment*, **2002**, 296, 105.
- Warhurst, M.A.; *An Environmental Assessment of Alkylphenol Ethoxylates and Alkylphenols*. **1995**.  
[http://www.foe.co.uk/resource/reports/ethoxylates\\_alkylphenols.pdf](http://www.foe.co.uk/resource/reports/ethoxylates_alkylphenols.pdf).
- Widarto, T.; Holmstrup, M.; Forbes, V.E.; *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **2004**, 58, 147.
- Working Document on Sludge,, Third Draft, European Commission, **2000**.
- 21 CFR parte 175.300, **FDA**. <http://law.justia.com/us/cfr/title21/21-3.0.1.1.6.3.1.6.html>

## 2. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS EN MUESTRAS AMBIENTALES.

### 2.1. Conceptos generales.

Los problemas que se pueden presentar en el análisis de compuestos orgánicos en muestras ambientales son muy diversos. La gran mayoría de compuestos orgánicos presentan la misma composición, están formados por C, O, H, N y en algún caso S y halógenos y se diferencian exclusivamente por su estructura molecular. Además, en ocasiones, los compuestos pueden sufrir alteraciones a causa de la temperatura, la luz, etc., por lo que es necesario utilizar técnicas de extracción que no alteren al compuesto durante el proceso, o bien lo hagan de una manera controlada y conocida. Por otro lado, la mayoría de los detectores utilizados para la determinación de compuestos orgánicos no son selectivos, con la excepción del espectrómetro de masas, por lo que requieren un cierto grado de limpieza de la muestra. Por todo ello es de gran importancia realizar procesos de preparación de muestra en los que no sólo se extraiga el analito de interés de la matriz en la que se encuentra, si no que también quede libre de interferencias y se encuentre en una concentración lo suficientemente alta para poder ser medido. Para ello, un método de tratamiento de muestra adecuado puede implicar tres etapas:

- Extracción.
- Preconcentración
- Limpieza.

El proceso de extracción es especialmente delicado, ya que se tiene que conseguir separar en su totalidad el analito de interés de la matriz en la que se encuentra.

Para saber si la extracción ha sido completa se utilizan dos procedimientos:

1. Extracciones sucesivas. Se realizan extracciones sucesivas en una muestra con un disolvente o mezclas de disolventes adecuados hasta que el analito deja de aparecer en el extracto. De esta forma se puede evaluar el número de extracciones necesarias para aislar por completo el analito.

2. Muestras enriquecidas. Se añade una cantidad de analito conocida y se compara la cantidad del analito añadido con la recuperada en el proceso de extracción. En este caso hay que asegurar que el analito que se añade se encuentre en el mismo estado que el analito original, por lo que es necesario dejar un tiempo de contacto con la matriz para que se alcance el equilibrio.

En la mayoría de los casos después de la extracción es necesario realizar procesos de limpieza para eliminar el mayor número posible de interferencias y en ocasiones es necesario realizar una preconcentración para poder alcanzar los límites de cuantificación de la técnica empleada para la determinación final.

A continuación se hará una breve exposición de las técnicas de extracción más comunes empleadas en el análisis de compuestos orgánicos en muestras medioambientales.

## **2.2. Extracción Sólido-Líquido.**

Es el método de extracción más empleado en la extracción de compuestos orgánicos de muestras sólidas.

El procedimiento a seguir se basa en la puesta en contacto de la muestra conteniendo los analitos con un disolvente o mezcla de disolventes adecuada para ser sometida posteriormente a distintos procesos que permitan separar el analito de la matriz. El proceso debe ser optimizado con el fin de extraer cuantitativamente los compuestos de interés y minimizar la co-extracción de otros compuestos que puedan ser interferentes a la hora de realizar la determinación final. En la figura 9 se recogen las etapas implicadas en un proceso de extracción sólido-líquido.

- Etapa 1. El disolvente penetra en el interior de la matriz sólida.
- Etapa 2. La presencia del disolvente provoca la desorción del analito que se encontraba adherido a puntos específicos de la matriz.
- Etapa 3. Una vez liberado el compuesto, éste debe difundir a través de la matriz sólida que lo contenía.

- Etapa 4. Al separarse de la matriz y difundir por la misma se disuelve en el disolvente.
- Etapa 5. Al igual que difundía por la matriz sólida, el compuesto debe difundir a través del disolvente y salir fuera de los poros de las partículas de la matriz sólida.
- Etapa 6. Los analitos son arrastrados por el disolvente al exterior.

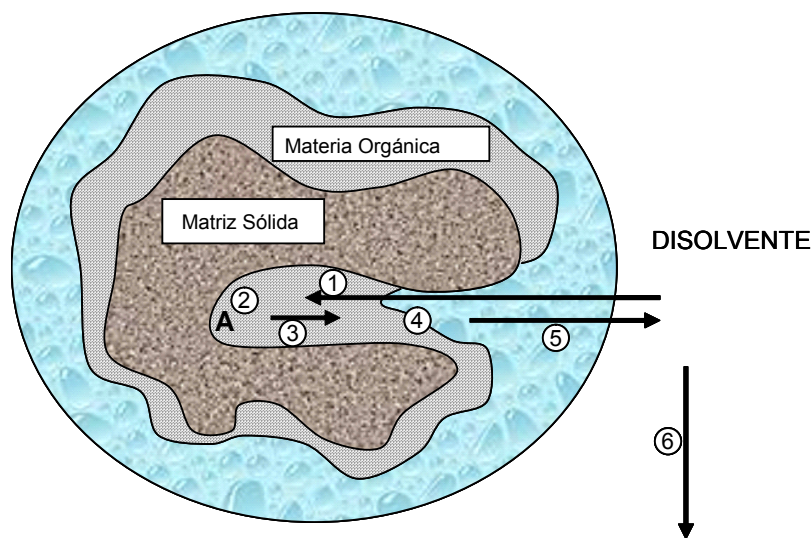


Figura 9. Esquema representativo de un proceso de extracción sólido-líquido.

A la hora de realizar la extracción es necesario optimizar una serie de parámetros como son: el disolvente empleado para la extracción, el volumen de disolvente, la temperatura, la presión y el tiempo de extracción. La optimización de estos parámetros permitirá conseguir extracciones cuantitativas y reducir el tiempo dedicado al proceso.

En la tabla 12 se recogen algunas de las técnicas de extracción sólido-líquido más utilizadas, así como las ventajas e inconvenientes más características de cada una de ellas (Cámara y col., 2002).

La selección de una u otra va a depender de la fortaleza de la interacción analito-matriz así como del material disponible en el laboratorio.

Tabla 12. Técnicas de extracción sólido-líquido.



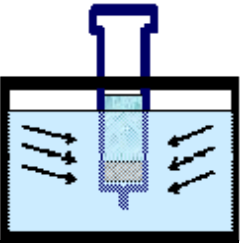
Técnica de Extracción	Esquema	Ventajas	Inconvenientes
Agitación	 	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Sencillo manejo.</li> <li>2. Útil para analitos débilmente unidos a la matriz.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Posibilidad de contaminaciones.</li> <li>2. Exposición del operador a disolventes tóxicos.</li> <li>3. Poca eficiencia de extracción.</li> </ol>
Extracción asistida por ultrasonidos		<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Sencillo manejo</li> <li>2. Se emplean volúmenes de disolvente pequeños.</li> <li>3. Bajo coste.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Riesgo de contaminación y pérdida del analito por la necesidad de evaporar</li> <li>2. Exposición a vapores tóxicos.</li> </ol>

Tabla 12. Técnicas de extracción sólido-líquido (continuación).

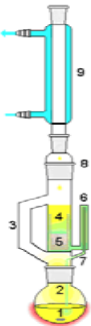
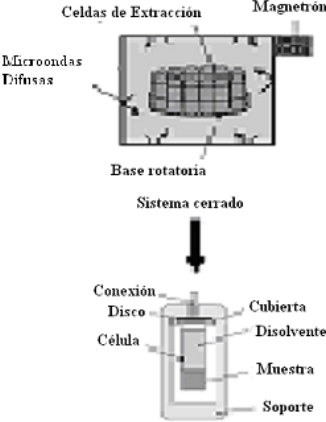
Técnica de Extracción	Esquema	Ventajas	Inconvenientes
<p>Soxhlet</p>	 <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Plato poroso.</li> <li>2. Matraz de destilación.</li> <li>3. Paso de destilación.</li> <li>4. Carcasa Porosa.</li> <li>5. Muestra sólida.</li> <li>6. Brazo de sifón de entrada del disolvente.</li> <li>7. Brazo de sifón de salida del disolvente.</li> <li>8. Adaptador.</li> <li>9. Condensador / reflujo.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Bajo coste.</li> <li>2. Útil para distintos tipos de muestra.</li> <li>3. Fácil manejo.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Largos tiempos de extracción, de 16 a 24 horas.</li> <li>2. Elevadas cantidades de disolventes orgánicos.</li> <li>3. Es necesario la evaporación de un gran volumen de disolvente.</li> </ol>
<p>Extracción asistida por microondas (Camel, 2001)</p>	 <p>Celdas de Extracción    Magnetron</p> <p>Microondas Difusas</p> <p>Base rotatoria</p> <p>Sistema cerrado</p> <p>Conexión    Disco    Cúbicula</p> <p>Célula    Disolvente    Muestra</p> <p>Soporte</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Minimiza el tiempo de extracción.</li> <li>2. La energía esta localizada y se aprovecha mejor.</li> <li>3. Se emplean volúmenes de disolvente pequeños.</li> <li>4. Robusto y fácil manejo.</li> <li>5. Permite extraer varias muestras a la vez.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Alto coste.</li> <li>2. El extracto obtenido debe ser filtrado.</li> <li>3. Degradación de compuestos termolábiles.</li> <li>4. Es difícil de automatizar y acoplar a otras técnicas.</li> </ol>

Tabla 12. Técnicas de extracción sólido-líquido (continuación).

Técnica de Extracción	Esquema	Ventajas	Inconvenientes
<p>Extracción con disolventes a alta presión (PLE).</p>	<p>El diagrama muestra un sistema de extracción a alta presión (PLE). El proceso comienza con un recipiente de disolvente que se conecta a una bomba. Después de la bomba, hay una válvula de purga y una válvula de presión. El sistema también incluye un cilindro de nitrógeno que se conecta al flujo principal. Un sistema de ventilación de residuos está conectado al sistema. El fluido pasa a través de una celda de extracción que se encuentra dentro de un horno. Después de la celda de extracción, hay una válvula estática que dirige el fluido a un vial colector.</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Bajo consumo de disolventes orgánicos.</li> <li>2. Rapidez.</li> <li>3. Se controlan todos los parámetros de la extracción (temperatura, presión, potencia).</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Elevado coste inicial.</li> <li>2. Depende del tipo de matriz.</li> </ol>

### 2.3. Extracción con fluidos supercríticos.

Los fluidos supercríticos son líquidos o gases en condiciones normales que llevados a unas condiciones operativas de elevada presión y temperatura moderada (por encima de su punto crítico) adquieren unas propiedades excelentes como extractantes gracias a su elevado poder disolvente en estado supercrítico. En estas condiciones el fluido supercrítico se considera un híbrido entre gas y líquido ya que tienen en común con los gases sus buenas características para difundir a través de la matriz, y con los líquidos, su elevado poder de solvatación. Todo ello les confiere propiedades excelentes como extractantes.

El fluido supercrítico más utilizado es el CO<sub>2</sub>, que es químicamente inerte, es inocuo, no es inflamable y su punto crítico es fácil de alcanzar (31,1°C y 71,8 atm). El único problema que presenta el CO<sub>2</sub> es que se trata de un fluido apolar y por tanto es adecuado únicamente para la extracción de analitos apolares. Para solucionar este problema se utilizan modificadores (ej: MeOH) que varían la polaridad del fluido supercrítico y permiten así la extracción de los compuestos más polares.

En la figura 10 se recoge un esquema del un equipo de extracción con fluidos supercríticos (SFE):

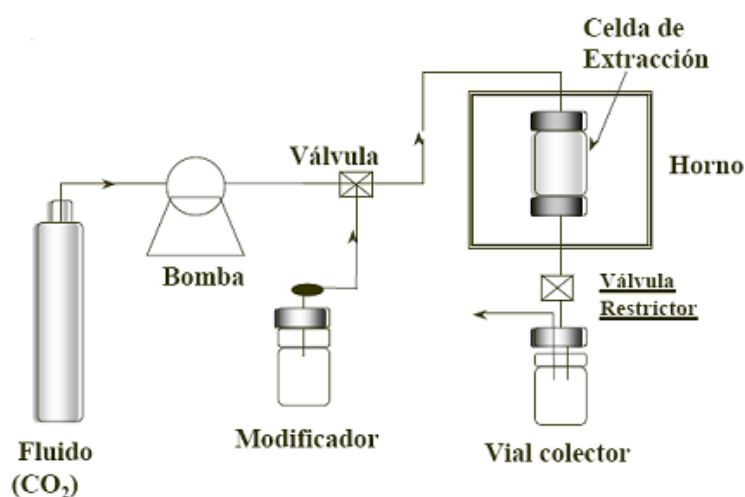


Figura 10. Esquema SFE

El proceso de extracción con fluidos supercríticos se realiza a una presión entre 150 y 450 atm y a temperaturas que varían de 40 a 150 °C, estando la muestra situada

en un cartucho de alta presión. Los analitos se recogen en un pequeño volumen de disolvente orgánico o bien se atrapan sobre un soporte adecuado (Lin y col., 1999).

Entre sus ventajas destacan la baja cantidad de disolventes orgánicos empleados, el uso de CO<sub>2</sub> que no es tóxico y permite conseguir cierta selectividad en la extracción y es un proceso rápido y automático. Pero también presentan una serie de inconvenientes como son su elevado coste, la necesidad del uso de modificadores para la extracción de compuestos polares, así como el limitado tamaño de muestra.

Esta técnica ha sido empleada para la extracción de 4-Nonilfenol en lodos (Lin y col., 1999) y sedimentos, (Yang y col., 2008), PCBs, PBDEs y POPs en tejidos de animales (Fidalgo-Used y col., 2007) o PCBs en suelos (Hallgren y col., 2006).

#### **2.4. Extracción con agua subcrítica.**

La extracción con agua subcrítica es una técnica derivada de la extracción con disolventes a alta presión y también recibe el nombre de extracción con agua caliente presurizada. En esta técnica la extracción se realiza con agua, a temperaturas superiores a 100°C y a elevada presión para mantenerla en forma líquida (agua subcrítica). Así es posible aumentar la solubilidad de los compuestos orgánicos en ella, pudiéndose utilizar la misma como base extractante y haciendo de la extracción una técnica más respetuosa con el medio ambiente y más económica que cuando se utilizan disolventes orgánicos. El mayor inconveniente que presenta esta técnica es que no es apropiada para compuestos lábiles, ya que el agua a altas temperaturas es muy oxidante (Hyötyläinen, 2009).

Existen varias aplicaciones de la extracción con agua subcrítica en el análisis ambiental como son por ejemplo bifenilos policlorados (Yang y col., 1995) o hidrocarburos policíclicos aromáticos en sedimentos (Fernandez-Gonzalez y col., 2008), fenoles en frutas (Khuwijitjaru y col., 2008) o antioxidantes fenólicos en muestras vegetales (Hartonen y col., 2007).

## 2.5. Dispersión de la matriz en fase sólida.

La extracción por dispersión de la matriz en fase sólida (Matrix Solid-Phase Dispersion, MSPD) es un proceso de extracción introducido en 1989 por Barked. En este proceso la muestra se mezcla con un adsorbente sólido y se tritura hasta la completa homogenización de la misma. Posteriormente esta mezcla se empaqueta en una columna y los analitos se eluyen con los disolventes apropiados. También existe la posibilidad de realizar una etapa previa de lavado para eliminar las interferencias. Aún así, por lo general es necesario un proceso posterior de limpieza mediante un extracción en fase sólida tradicional (Barked y col., 1989).

Esta técnica es especialmente útil para muestras sólidas o semi-sólidas, y entre sus ventajas destacan la simplicidad, la poca cantidad de muestra y disolventes orgánicos, unos tiempos de extracción cortos y que no se requiere preparación o mantenimiento de un equipo. En cuanto a la selectividad de la MSPD, ésta depende de los adsorbentes utilizados, pero son muchas las aplicaciones que se han hecho en muestras complejas, como por ejemplo la determinación de distintos pesticidas en muestras de fruta, vegetales y tejidos de animales (Kristenson y col., 2006; Albero y col., 2003).

## 2.6. Extracción líquido-líquido.

La extracción líquido-líquido es la técnica de extracción, preconcentración y limpieza más ampliamente utilizada en el análisis de muestras o extractos líquidos. Se basa en la transferencia de un analito de una muestra a un disolvente por el que tiene una mayor afinidad y que es inmiscible con la muestra (Fig. 11).

Al poner en contacto la muestra con el disolvente y después de un periodo de agitación se produce un equilibrio de reparto del analito ente la muestra y el disolvente utilizado para la extracción. Cuanto mayor sea la constante de distribución ( $K = \frac{\text{concentración analito en el disolvente}}{\text{concentración analito en la muestra}}$ ) mayor será la eficiencia de la extracción. Hay varios factores que pueden afectar a la extracción líquido-líquido, el fundamental es la polaridad de los analitos en estudio que es

recomendable conocer a priori para una correcta elección del disolvente extractante. También es importante el volumen de disolvente, el número de extracciones y, en algunos casos, también puede modificarse el pH o la fuerza iónica del medio favoreciéndose de este modo la extracción.

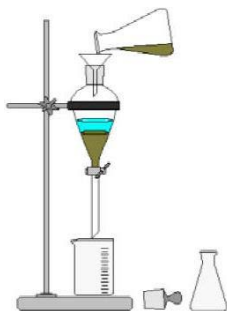
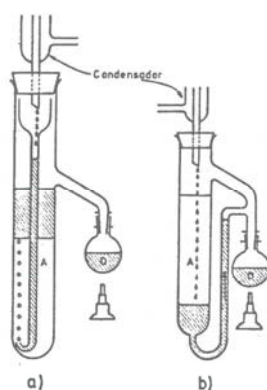


Figura 11. Representación de la extracción liquido-liquido discontinua convencional con un embudo de decantación.

Una variedad de esta técnica es la extracción liquido-liquido en continuo. Se suele utilizar para aquellos compuestos que presentan una cinética lenta, es decir, compuestos que tardan mucho en alcanzar el equilibrio. El procedimiento se basa en un flujo continuo de fase extractante a través de la muestra y depende de las densidades relativas de la fase acuosa y de la fase orgánica. Como principales ventajas presenta altos rendimientos y un menor consumo de disolventes, pero es una técnica que consume mucho tiempo y se producen pérdidas de los analitos volátiles y degradación de los termolábiles. En la figura 12 se representa un esquema de este proceso.



Menos denso

Más denso

Figura 12. Representación de la extracción liquido-liquido en continuo.

Actualmente también se tiende a utilizar la microextracción líquido-líquido, con la idea de facilitar la automatización y disminuir el consumo de disolventes. La microextracción líquido-líquido o también denominada microextracción en fase líquida, fue introducida por primera vez en 1996 y se basa en la utilización de una pequeña gota de disolvente orgánico que se encuentra al final de la aguja de una microjeringa. La gota se sitúa en una muestra acuosa y los analitos se extraen mediante difusión pasiva, posteriormente la gota se introduce en la jeringa y de aquí a un cromatógrafo de gases para el análisis final.

Son muchos los ejemplos en los que se ha utilizado esta técnica para la separación o extracción de distintos compuestos como por ejemplo la ciclofosfamida en orina (Sottani y col., 1996) o codeína en agua (Petersen-Bjergaard y col., 2005).

## **2.7. Extracción en fase sólida.**

La extracción en fase sólida es una técnica de preparación y tratamiento de muestra que se basa en la retención de los compuestos de una muestra o extracto líquido en una fase sólida y su posterior elución con un disolvente adecuado.

Esta técnica se utiliza fundamentalmente para la limpieza y preconcentración de muestras, cambio de fase, y conservación o transporte de la muestra. Ha sido utilizada tanto para el análisis medioambiental como biomédico y/o toxicológico así como en el análisis de alimentos. Un ejemplo es su uso para la determinación de 33 sustancias presentes en la lista REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemical Substances) en muestras de aguas, entre estas sustancias se encuentran los compuestos organoclorados, organofosforados, pesticidas, carbamatos, fungicidas, ftalatos, alquilfenoles y bisfenol A (Baugros y col., 2008).

Se puede realizar en distintos formatos como son discos, cartuchos y jeringas pero el modo de trabajar es común en todos ellos, pudiéndose distinguir 4 etapas fundamentales:

1. Acondicionamiento del adsorbente con disolventes de naturaleza similar a las muestras que se van a cargar.

2. Carga de la muestra que contiene el analito en un disolvente determinado.
3. Lavado con un disolvente o mezcla de disolventes con el fin de eliminar interferencias procedentes de la matriz pero sin romper las interacciones entre el adsorbente y los analitos a determinar.
4. Elución. En esta última etapa se deben utilizar disolventes o mezcla de disolventes que rompan las interacciones con el adsorbente.

A la hora de realizar la extracción en fase sólida hay que tener en cuenta dos parámetros de gran importancia como son la capacidad del adsorbente, que es la máxima cantidad de analito que puede quedar retenida en el adsorbente y el volumen de ruptura, que es el volumen máximo de muestra que puede pasar por el adsorbente sin que se produzcan pérdidas por efecto lavado.

Existen distintos tipos de adsorbente y su elección se debe realizar en función de las características de analito que se desee determinar. En la tabla 13 se recogen algunos ejemplos de los adsorbentes más ampliamente utilizados.

Como se ha mencionado anteriormente, la elección de una fase sólida u otra va a depender del tipo de analito y de la matriz en la que se encuentra. Por ejemplo para el aislamiento de compuestos apolares en una matriz polar se utilizan fundamentalmente como fases sólidas C<sub>18</sub>, C<sub>8</sub> o fenil entre otras, mientras que si se trata de compuestos polares en matrices apolares se suelen utilizar fases como sílice, NH<sub>2</sub>, Florisil, o Diol. En el caso que se deseen aislar compuestos ionizables se utilizan intercambiadores iónicos tipo SAX o SCX (strong anion o cation exchanger).

Tabla 13. Tipos de fase sólida utilizados en la extracción en fase sólida.

<b>ALQUÍL-SÍLICAS</b>	Apolares	Octil (C <sub>8</sub> ) Octadecil (C <sub>18</sub> ) Ciclohexil Ciclofenil		
	Polares	Cianopropil Aminopropil Dioles		
	Cambio iónico	Catiónico (SCX)	Ácidos sulfónicos Ácidos Carboxílicos	
		Aniónico (SAC)	Aminas terciarias	
<b>OTROS</b>	Apolares	Resinas modificadas	Estireno-DVB Metacrilato	
	Polares	Gel de sílice Alúmina Florisil		
	Exclusión molecular			
	Sorbentes de afinidad	Inmunosorbentes		
		Polímeros.		

## **2.8. Polímeros de impresión molecular (MIPs).**

### **2.8.1. Generalidades.**

Los polímeros de impresión molecular (MIPs) son materiales poliméricos que presentan cavidades específicas complementarias en forma, tamaño y grupos funcionales a un compuesto determinado. En los MIPs el mecanismo de interacción analito-cavidad imita el mecanismo de reconocimiento molecular que se produce de forma natural en la reacción antígeno-anticuerpo. Su estabilidad, fácil preparación y su bajo coste hacen que los MIPs sean materiales muy atractivos para un gran número de aplicaciones, entre las que destacan fases estacionarias en columnas para HPLC, sensores, inmunoensayos, así como su empleo como adsorbentes selectivos para la extracción en fase sólida de compuestos presentes en matrices complejas.

La técnica para la obtención de los polímeros de impresión molecular se basa en la síntesis de un polímero altamente entrecruzado alrededor de un analito plantilla en presencia de un monómero adecuado. En una primera etapa se ponen en contacto el analito y el monómero, en el disolvente (porogen) seleccionado para formar el complejo de prepolimerización. Posteriormente, se añade el entrecruzante y finalmente el iniciador para comenzar la polimerización. La polimerización suele ser radicalica y puede estar inducida tanto fotoquímica como térmicamente. Una vez obtenido el polímero, éste se somete a un proceso de intenso lavado en el que se elimina la plantilla, dejando libres en la red polimérica sitios de unión que son complementarios en forma, tamaño y orientación de grupos funcionales al analito plantilla. En la figura 13 se recoge un esquema del proceso de síntesis de un polímero de impresión molecular.

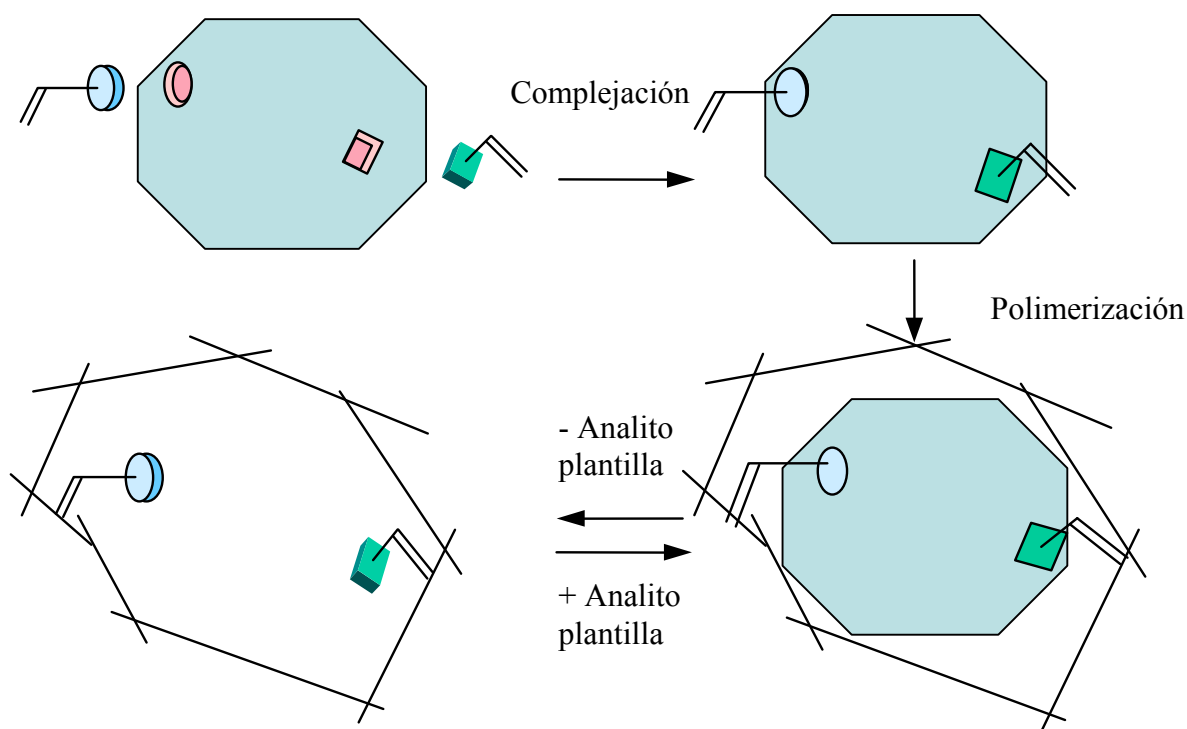


Figura 13. Esquema de la preparación de polímeros de impresión molecular.

### 2.8.2. Síntesis de los polímeros de impresión molecular.

Según el tipo de interacción analito-polímero se distinguen tres modelos de MIPs.

*Polímeros covalentes.* Los primeros trabajos de impresión molecular con polímeros orgánicos sintéticos se basaron en el modelo covalente y fueron presentados en el año 1972 por el grupo de Gunter Wulff (Wulff y col., 1972). Este modelo se basa en la unión mediante enlace covalente del analito plantilla y el monómero, tanto durante la polimerización, como en el posterior reconocimiento de los analitos. En la mayoría de los casos, las plantillas empleadas han sido sintetizadas en el laboratorio partiendo de moléculas con grupos dioles en su estructura capaces de formar ésteres cíclicos con monómeros que contengan ácido bórico.

En la figura 14 aparecen algunas estructuras de los complejos plantilla-monómero necesarios para la formación de los polímeros covalentes.

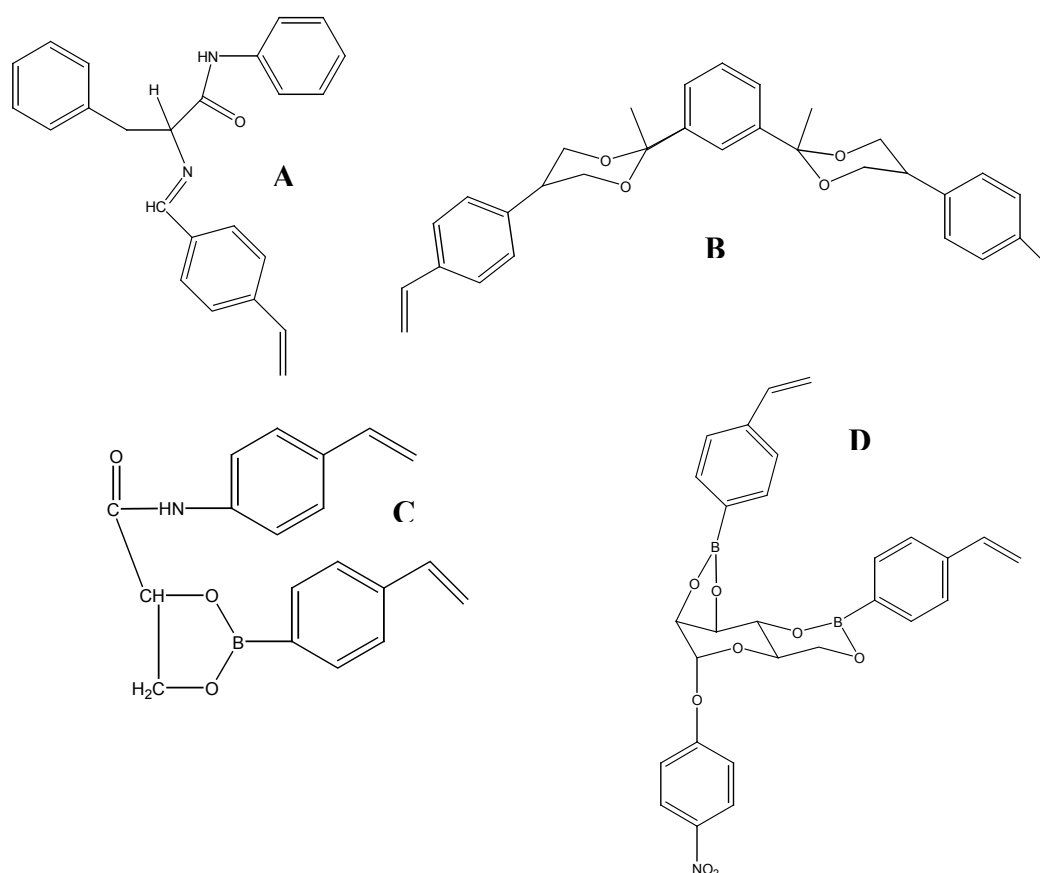


Figura 14. Estructura de algunos complejos utilizados en la síntesis de polímeros covalentes. A. Base se Schiff de fenilalanina anilida con 4-vinilbenzaldehido, B. Bis-Ketal de 1,3-diacetilbenceno con diol polimerizable. C. derivado de ácido glicérico que es una combinación entre enlace covalente irreversible (amida) y reversible (éster de borato) D. 4-nitrofenil- $\alpha$ -D-manopiranosido-2,3:4,6-di-O (vinilfenilboronato),

Una vez formado el complejo, éste polimeriza en presencia de una gran cantidad de agente entrecruzante formándose una red rígida. Para eliminar el complejo inicial es necesario revertir los enlaces covalentes utilizando por ejemplo hidrólisis a reflujo.

Las principales ventajas que presenta este modelo residen en su extraordinaria selectividad, ya que en la preparación de polímero es posible controlar la estequiometría del complejo formado (plantilla-monomero), por lo que se evita la presencia de monómeros fuera de las cavidades, minimizando así las interacciones no específicas.

Esta distribución homogénea de los sitios de unión los convierte en polímeros óptimos como fases estacionarias para HPLC o cromatografía electroforética. Sin embargo, su aplicabilidad es limitada, ya que no existen muchos monómeros que formen enlace covalente reversible con los analitos plantilla. Este inconveniente junto con la mayor facilidad de preparación de los polímeros no-covalentes hace que su utilización no esté muy extendida. Aún así existen algunos ejemplos de polímeros covalentes específicos para la nortriptilina (Khasawneh y col., 2001) o el bisfenol A (Ikegami y col., 2004).

*Polímeros semi-covalentes.* Fueron desarrollados por primera vez en 1995 por Whitcombe y su equipo. Es un método que se puede considerar un híbrido entre el método covalente y el no covalente ya que la interacción inicial entre el analito plantilla y el monómero es mediante enlace covalente mientras que en el reconocimiento posterior del analito la interacción es no covalente. La combinación de ambos tipos de interacción facilita el trabajo con respecto al método covalente ya que el no tener que formar un enlace covalente reversible permite la utilización de un mayor número de monómeros y analitos que pueden formar entre ellos enlaces más fuertes y estables (Whitcombe y col., 1995).

Al igual que los polímeros obtenidos mediante el método covalente, los polímeros semi-covalentes presentan una alta selectividad y una mayor homogeneidad en la distribución de sitios de unión en la matriz polimérica. El mayor inconveniente reside en que la distancia necesaria para formar enlaces no covalentes es mayor que la de los covalentes, de forma que en ocasiones los huecos generados mediante interacción covalente son demasiado pequeños para la posterior unión no covalente. Este problema fue resuelto por Whitcombe utilizando un grupo carbonilo como espaciador entre el monómero y el analito plantilla que posteriormente se eliminaba en forma de CO<sub>2</sub>. Así los impedimentos estéricos quedaban eliminados.

Este tipo de polímeros fue utilizado para la limpieza de triazinas en muestras de suelo y vegetales (Cacho y col., 2006). En la figura 15 aparece un esquema en el que se representa la formación del compuesto de pre-polimerización y posteriormente la preparación de polímero.

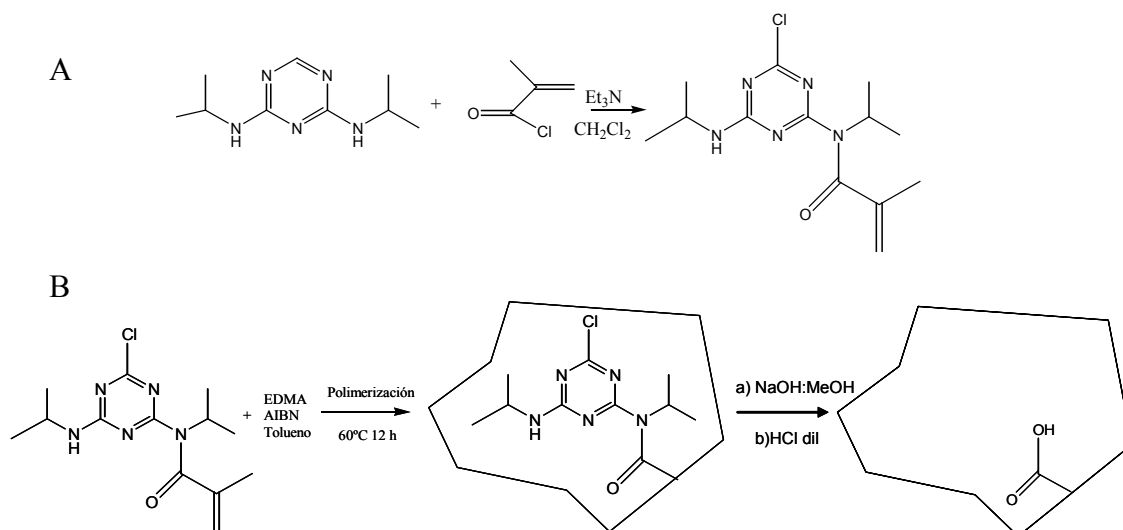


Figura 15. A) Síntesis del compuesto pre-polimérico metacrilato de propazina. B) Esquema de preparación de polímero semi-covalente de propazina (Cacho y col., 2006).

*Polímeros no-covalentes.* El método no covalente fue introducido por primera vez en 1981 por Arshady y Mosbach (Arshady y col., 1981), y actualmente es el método más utilizado debido a los buenos resultados obtenidos así como a la sencillez en la preparación de los polímeros.

La síntesis de los MIPs no covalentes se basa en la interacción compuesto plantilla con un monómero que presenta grupos funcionales apropiados para formar enlaces no covalentes (p.ej. puentes de hidrógeno) en el disolvente (porogen) adecuado. Después de la síntesis, la plantilla se elimina mediante un proceso de lavado más o menos agresivo con un disolvente o mezcla de disolventes, dejando libres los huecos de unión para el posterior reconocimiento de los analitos. En la figura 16 se muestra un ejemplo de un proceso de síntesis de polímeros de impresión no covalente para fosfatos.

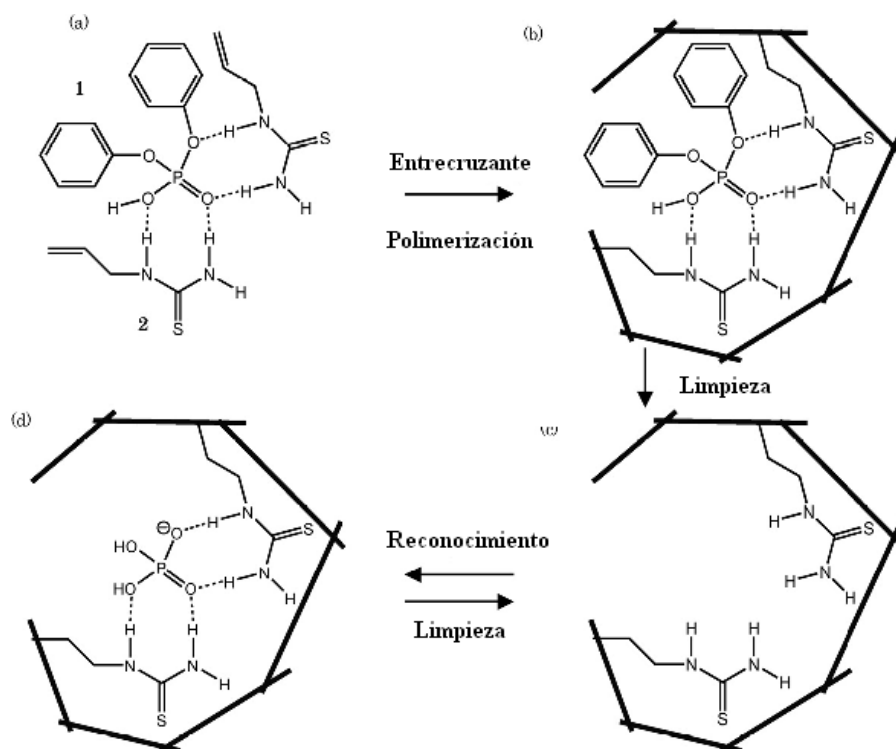


Figura 16. Esquema de la preparación de un polímero no-covalente selectivo para fosfatos: a) el difenilfosfato (plantilla) junto con el 1-allyl-2-tiourea (monómero) se mezcla con acetonitrilo (disolvente); b) se inicia la polimerización con la adición del etilenglicol dimetacrilato (entrecruzante); c) formación un hueco de unión específico tras la eliminación de la plantilla; d) reconocimiento selectivo (Kugimiya y col., 2008).

En este modelo, y para favorecer el equilibrio de formación del complejo de prepolimerización, se trabaja empleando un gran exceso de monómero; típicamente relación molar 1:4 (plantilla:monómero). Si bien así se garantiza la integridad del complejo, esta forma de trabajar conlleva que queden en la red polimérica restos de monómero libre que posteriormente dará lugar a interacciones no específicas con el analito.

Aún así, y debido a la amplia disponibilidad comercial de monómeros y analitos capaces de formar enlaces no covalentes estables, es hoy en día el modelo más utilizado.

### 2.8.3. Componentes de la mezcla de polimerización.

#### *Analito plantilla y monómero.*

La selección del monómero va a depender de las características y de los grupos funcionales que contenga el analito, con el que debe poder formar un complejo de prepolimerización suficientemente estable. Por otra parte, cuanto mayor sea el número de interacciones complementarias aumentará la afinidad y selectividad de los sitios de unión obtenidos. Así, y especialmente en el caso de los polímeros no covalentes, es recomendable seleccionar como analito plantilla compuestos con varios grupos funcionales.

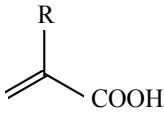
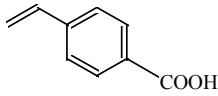
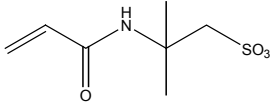
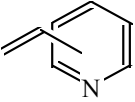
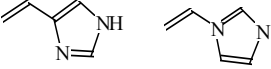
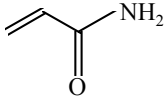
Por lo general como compuesto plantilla se suele seleccionar el compuesto que se desea determinar, o si es una familia de compuestos, el que posea un mayor tamaño o número de grupos funcionales. En estos casos es especialmente necesaria la eliminación completa del analito plantilla del polímero, antes de llevar a cabo las extracciones analíticas, a fin de evitar que se produzcan falsas recuperaciones (*leaking*). Por lo general el uso de un Soxhlet con mezclas de metanol/ácido acético o acetonitrilo/ácido acético 50/50 durante 10–12 horas suele eliminar la mayoría de los compuestos plantilla cuando la interacción se produce por puentes de hidrógeno. Otra opción es la utilización como analito plantilla de un compuesto que no se desee determinar pero que presente una gran similitud en cuanto a forma, tamaño y funcionalidad con el compuesto en estudio, de esta manera se elimina el riesgo de *leaking* por parte del compuesto plantilla. Algunos ejemplos son el polímero de cyromazina utilizado para la extracción de melamina en piensos y leche (He y col., 2009), el polímero de ciclododecil 2,4-dihidroxbenzoato para el análisis de zearalenona (Urraca y col., 2006), el polímero de 4-t-butilfenol para la extracción de bisfenol A en muestras de agua (Kawaguchi y col., 2005) o el polímero de 6-cetoecradiol para la determinación de 17- $\beta$ -estradiol en agua de río (Watabe y col., 2006).

Los monómeros más empleados hasta el momento han sido el ácido metacrílico (MAA), el cual resulta muy apropiado para aquellos analitos que presentan grupos funcionales básicos en su estructura susceptibles de enlazarse con él mediante puentes de hidrógeno (Kempe y col., 1993) y la vinilpiridina, la cual es útil para los analitos que

contengan grupos ácidos (Ramström y col., 1993). De manera general se puede establecer que se utilizará un monómero con propiedades ácidas cuando el analito plantilla sea básico y viceversa. En los polímeros no covalentes se utiliza exceso de monómero (1:4) para garantizar la formación del compuesto de prepolimerización (analito-monómero), pero el problema que presenta este exceso es que el monómero sobrante queda libre en la red polimérica. Como se ha mencionado anteriormente, esto conlleva la posibilidad de que se produzcan uniones con los analitos u otros interferentes fuera de las cavidades específicas, dando lugar a interacciones no específicas que hay que eliminar mediante la optimización de la etapa de lavado. En la tabla 14 se resumen los monómeros más empleados en la síntesis de MIPs no covalentes.

En el método covalente los monómeros a utilizar deben de presentar grupos que interaccionen con los analitos mediante enlace covalente reversible. Los más utilizados son los derivados de ácido borónico (Sallacan y col., 2002), ya que las interacciones entre el polímero y los analitos son bastante rápidas por lo que se puede emplear como fase estacionaria en procesos cromatográficos (Marty y col., 2005). También se han utilizado ácidos carboxílicos (Damen y col., 1980), bases de Schiff (Shea y col., 1980), cetales (Shea y col., 1989) y hemiacetales (Shea y col., 1991). En la figura 14, se representaron algunos complejos de prepolimerización utilizando estos monómeros para la determinación de nucleótidos (Sallacan y col., 2002), aminoácidos (Wulff y col., 1986), alcoholes (Alexander y col., 1999) y carbohidratos (Wulff y col., 1991).

Tabla 14. Monómeros utilizados en polímeros de impresión molecular no covalentes.

Monómero	Estructura	Tipo de interacción	Aplicaciones	Ref.
Acidos acrílicos (R= H, CH <sub>3</sub> , CF <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> COOH)		- Enlaces de hidrógeno - Iónicas	Aminoácidos  Péptidos  Teofilina  Nicotina  Triazinas	Sellergren y col., 1988  Ramström y col., 1994  Vlatakis y col., 1993  Matsui y col., 1997  Cacho y col., 2004
Acidos vinilbenzoicos		- Enlaces de hidrógeno - Iónicas	Aminoácidos	Andersson y col., 1984
Acidos acrilamido sulfónicos		- Iónicas	Desmetrín	Piletsky y col., 2000
Vinilpiridinas		- Iónicas - Enlaces de hidrógeno - Transferencia de carga	Naproxeno  Aminoácidos	Kempe y col., 1994  Kempe y col., 1993
Vinilimidazoles		- Iónicas - Enlaces de hidrógeno - Coordinación	ATP  Aminoácidos	Mathew y col., 1995  Kempe y col., 1993
Acilamidas		Enlaces de hidrógeno	Aminoácidos	Yu y col., 1997

*Porogen o disolvente.*

Una elección correcta del disolvente o mezcla de disolventes (porogen) para la polimerización es también determinante, ya que la efectividad de la unión entre la plantilla y el monómero así como la morfología del material formado (tamaños de poro y áreas específicas) va a venir determinada en gran medida por las características físicas y químicas del porogen.

En el caso de los polímeros basados en puentes de hidrógeno, para facilitar las interacciones del monómero con el analito plantilla, y por tanto la formación del complejo, se suelen utilizar disolventes apróticos, tales como tolueno, diclorometano, cloroformo o acetonitrilo. Estos disolventes, al presentar bajas constantes dieléctricas, favorecen las interacciones no covalentes, es decir, puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas y fuerzas de Van der Waals, típicas de los MIPs no covalentes. Sin embargo, este tipo de disolventes hace complicado el uso de los MIPs directamente con muestras acuosas, aunque sí existen algunas aplicaciones recientes en este tipo de muestras (Beltrán y col., 2007).

*Entrecruzante.*

La integridad estructural del complejo de pre-polimerización y, por lo tanto la obtención de cavidades bien definidas en la red polimérica, depende directamente de la naturaleza y de la cantidad de entrecruzante empleado (Selligren y col., 1999). Este entrecruzante debe ser capaz de interaccionar con el complejo de pre-polimerización y preservarlo durante la síntesis del polímero. Sus funciones más representativas son: (a) es el principal responsable de la morfología de la matriz polimérica, (b) estabiliza los sitios de unión selectiva, (c) confiere estabilidad mecánica y térmica al polímero sintetizado y (d) proporciona la porosidad adecuada para garantizar la accesibilidad del analito a las cavidades generadas (Piletsky y col., 2002). En la tabla 15 se recogen algunos de los entrecruzantes más utilizados así como sus aplicaciones.

Tabla 15. Entrecruzantes más utilizados en la síntesis de polímeros de impresión molecular

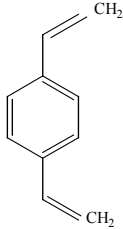
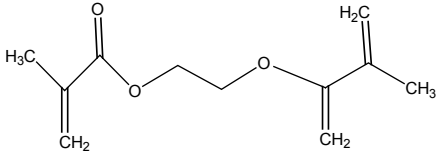
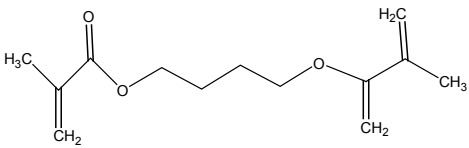
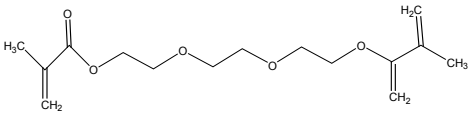
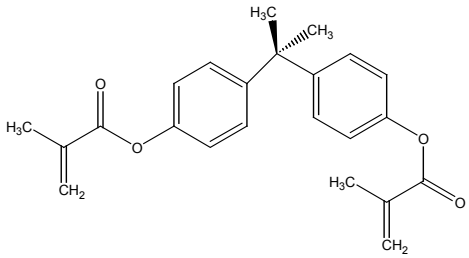
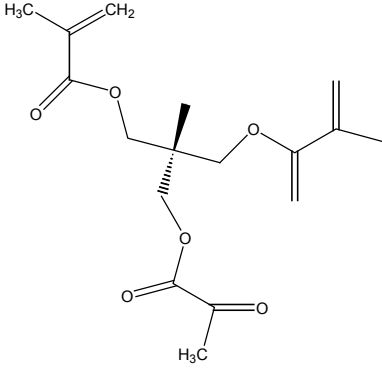
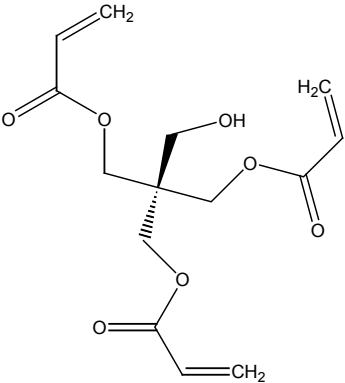
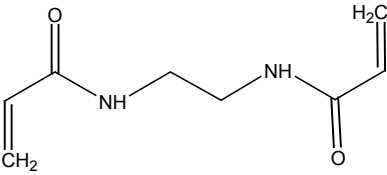
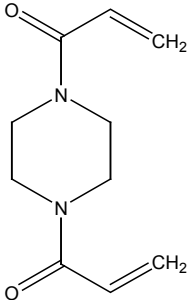
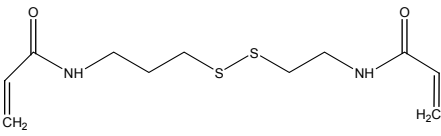
Entrecruzante	Estructura	Aplicaciones	Ref.
Divinil benceno (DVB)		Nicotina Bilirrubina	Sambe y col., 2006 Wu y col., 2006
Etilenglicol-Dimetacrilato (EDMA)		Triazinas Tiabendazol	Carabias-Martinez y col., 2006 Turiel y col., 2005
1,4-butanodiol-dimetacrilato		Fenilalanina	Zhan y col., 1999
Trietilglicol-dimetacrilato		Atrazina	Sergeyeva y col., 1999
Bisfenol A-Dimetacrilato		Enantiómeros	Wulff y col., 1987

Tabla 15. Entrecruzantes más utilizados en la síntesis de polímeros de impresión molecular (continuación).

Entrecruzante	Estructura	Aplicaciones	Ref.
Trimetilolpropano trimetacrilato (TRIM)		Estradiol Zearalenona	Zhu y col., 2007 Navarro-Villoslada y col., 2007
Pentaeritriol triacrilato		Efedrina Aminoácidos	Dong y col., 2002 Kempe, 1996
Etilen-bis-acrilamida		Aminoácidos	Ohkubo y col., 2001
1,4-diacriloilpiperazina		Fenilalanina	Piletsky y col., 1998
N,N'-bis-(acroil)cistamina		Calcio	Hiratani y col., 2001

Como puede apreciarse en esta tabla, hay entrecruzantes de muy diversa naturaleza siendo el etilenglicol dimetacrilato (EDMA), el divinil benceno (DVB) y el trimetilolpropano trimetacrilato (TRIM) los más utilizados.

#### 2.8.4. Técnicas de síntesis de polímeros de impresión molecular.

##### *Polimerización en bloque.*

La síntesis en bloque fue el primer método empleado en la preparación de MIPs y se trata posiblemente del método de polimerización más utilizado (Mayes y col., 2005). Brevemente, dicho método consiste en la polimerización radicalica de una disolución concentrada de monómeros alrededor del compuesto plantilla. La polimerización se puede iniciar tanto fotoquímica como térmicamente y una vez que se ha completado, se obtiene un monolito de polímero el cual es triturado, molido y tamizado hasta obtener partículas del orden de 25 – 50  $\mu\text{m}$ . El último paso consiste en la eliminación de las partículas más finas que se realiza mediante sedimentación. A pesar de la facilidad en su preparación la polimerización en bloque conlleva mucho tiempo, un trabajo tedioso y un bajo rendimiento (pérdida de alrededor del 40% del material obtenido) (Bruggemann y col., 2000). Por otra parte, como es posible observar en la micrografía de la figura 17, se obtienen partículas con formas irregulares, lo que en ocasiones puede limitar su empleo como fase estacionaria en LC y CEC. En la figura 17 aparece un esquema del proceso de polimerización en bloque y una micrografía de las partículas formadas.



Figura 17. Proceso de polimerización en bloque y micrografía electrónica de un polímero de impresión molecular sintetizado por polimerización en bloque. (Pérez-Moral y col., 2004)

Aunque como hemos citado anteriormente la polimerización en bloque sea el método más utilizado, con el fin de mejorar las propiedades de los materiales obtenidos se han desarrollado otras técnicas que permiten obtener partículas esféricas y mayor homogeneidad de sitios de unión. Entre estos métodos destacan la polimerización por precipitación, la polimerización por suspensión, la polimerización por hinchamiento en dos etapas y la polimerización sobre partículas de sílice.

#### *Polimerización por precipitación.*

El procedimiento de preparación de los polímeros por precipitación es similar al de polimerización en bloque, pero se utiliza un mayor volumen de porogen, manteniendo la proporción de plantilla:monómero:entrecruzante 1:4:20. En la polimerización por precipitación, el crecimiento de las cadenas de polímero no ocupa todo el volumen del disolvente empleado, y da lugar a una dispersión de partículas esféricas independientes en el seno de la disolución. Esto evita la necesidad de romper el recipiente en el que se lleva a cabo la polimerización.

La polimerización por precipitación, como se ha mencionado anteriormente, se realiza bajo altas condiciones de dilución ( $< 5\%$  w/v monomero/porogen) y por lo general se obtienen partículas esféricas de diámetro aproximado de  $1 \mu\text{m}$ . Para obtener partículas de mayor tamaño es necesario ajustar los parámetros de solubilidad del entrecruzante con el de los disolventes. Así, por ejemplo utilizando como porogen AcN/Tol 75/25 y divinilbenceno como entrecruzante (parámetros de solubilidad del acetonitrilo, tolueno y divinilbenceno de 24.6, 18.6 y 17-18 Mpa respectivamente) se han llegado a obtener partículas con diámetros de  $5 \mu\text{m}$  (Wang y col., 2003). La utilización de un porogen distinto puede provocar la no formación de partículas o dar lugar a aglomerados.

Entre las principales ventajas de esta técnica de polimerización se encuentran, además de la ya mencionada obtención de partículas esféricas, el alto rendimiento de polimerización al no ser necesario someter al polímero obtenido a las etapas de triturado y tamizado. Además, se ha comprobado experimentalmente que los polímeros obtenidos mediante precipitación poseen, en comparación con los obtenidos por polimerización en

bloque, una mayor capacidad y una distribución más homogénea de los sitios de unión (Shuting y col., 2007; Baggiani y col., 2005).

Se han publicado varios trabajos describiendo polímeros sintetizados utilizando este tipo de polimerización, con aplicaciones medioambientales como son la determinación de fenuron en muestras vegetales (Tamayo y col., 2003), de benzimidazoles en muestras de agua (Cacho y col., 2009) o como fase estacionaria para LC en la determinación de tiabendazol en fruta (Turiel y col., 2005). En la figura 18 aparece un esquema del proceso de polimerización y una micrografía de las partículas formadas.

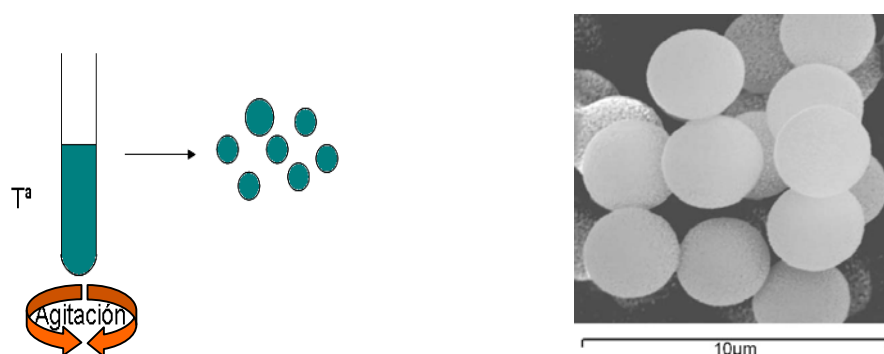


Figura 18. Proceso de polimerización por precipitación y micrografía electrónica de un polímero de impresión molecular sintetizado por polimerización por precipitación (Turiel y col., 2005).

#### *Polimerización por suspensión.*

En la polimerización por suspensión, se combinan un medio orgánico hidrofóbico, en el que se encuentra la mezcla de polimerización, y un medio dispersante orgánico o acuoso inmiscible con el anterior. El empleo de una fase acuosa es mucho menos frecuente ya que puede dificultar seriamente la interacción entre el analito y el monómero. La mezcla de ambos medios se agita, formándose micro-gotas en suspensión en las que tiene lugar la polimerización (Daniel y col., 2005). La principal ventaja de este procedimiento es que permite controlar el tamaño de las partículas, ya sea mediante la adición de un estabilizador como polivinilalcohol o líquidos iónicos o por el control de la velocidad de agitación (Hong y col., 2006; Guerrero-Sánchez y col., 2006; Maggioris y col., 2000). Este proceso de polimerización ha dado lugar a

partículas que se han utilizado en procesos de extracción en fase sólida para triazinas (Matsui y col., 1997), bisfenol A (Kawaguchi y col., 2005) y benzo(a)pireno (Chapuis y col., 2006).

En la figura 19 aparece un esquema del proceso de polimerización y una micrografía de las partículas formadas.

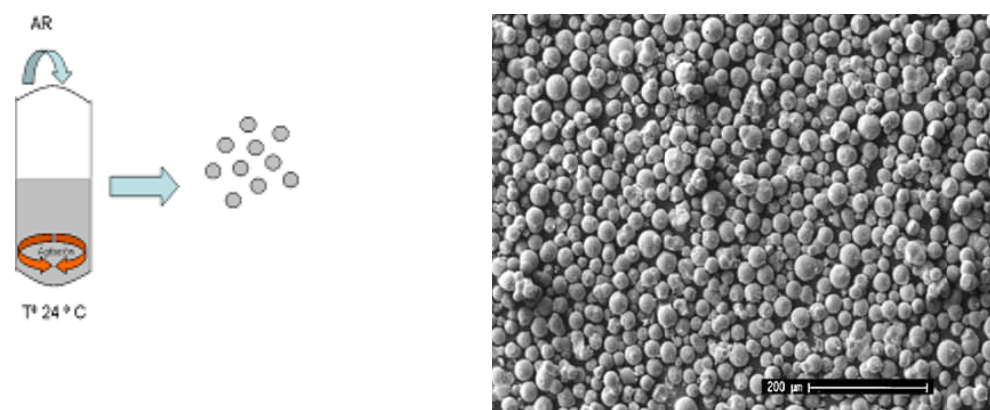


Figura 19. Proceso de polimerización por suspensión y micrografía electrónica de un polímero de impresión molecular sintetizado por polimerización en suspensión (Pérez-Moral y col., 2004)

#### *Polimerización por hinchamiento en dos etapas.*

Este método de polimerización fue desarrollado por el grupo de Haginaka en 1994 (Hosoba y col., 1994) y optimizado más tarde por ese mismo grupo (Haginaka y col., 2000). En este método se sintetizan partículas esféricas de latex en medio acuoso, que se van hinchando mediante la adición de un disolvente, para posteriormente impregnarlas con una mezcla de prepolimerización y sintetizar así polímero en la superficie de las esferas. Los tamaños de partícula obtenidos varían entre 2 y 50 µm. La dificultad de este método reside en encontrar una superficie hidrofílica que no modifique la selectividad del polímero y, por otro lado, el hecho de utilizar un medio acuoso dificulta las interacciones no covalentes por lo que hay que trabajar con otro tipo de interacciones (Tsukagoshi y col., 1995). Este procedimiento ha sido utilizado para la

extracción selectiva de triazinas (Sambe y col., 2007) y  $17\beta$ -estradiol en agua de río (Le Noir y col., 2007).

En la figura 20 se muestra un esquema del proceso de polimerización y una micrografía de las partículas formadas.

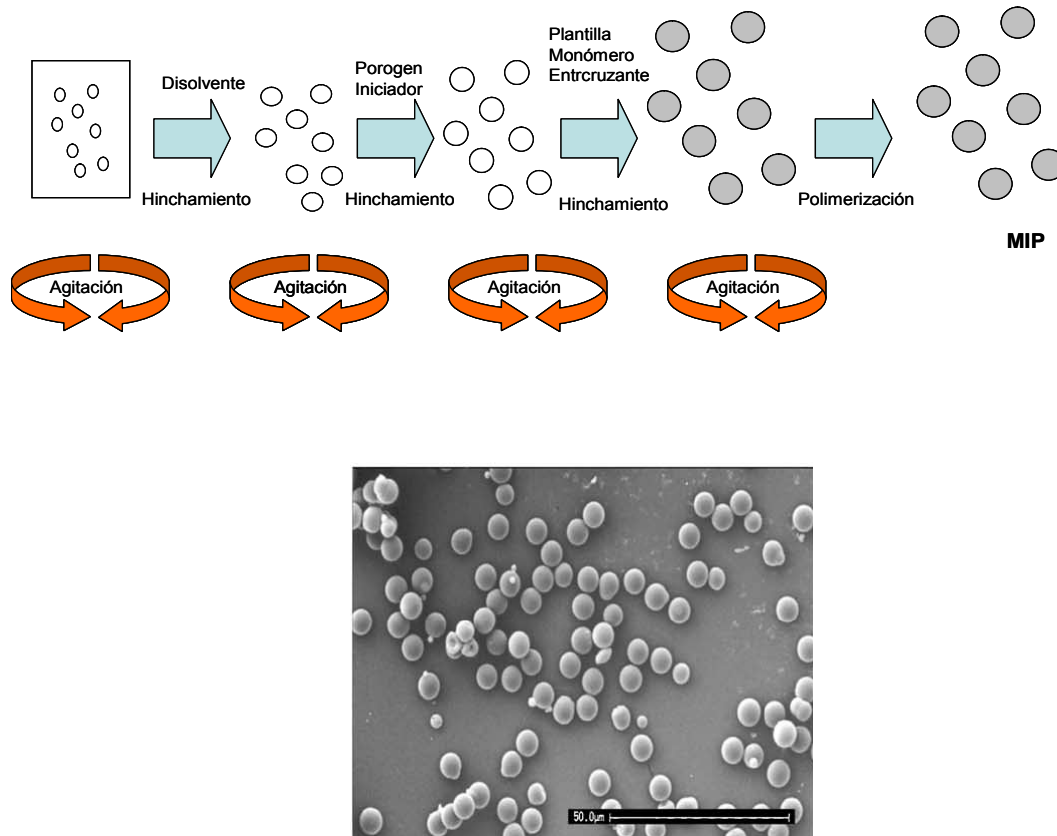


Figura 20. Proceso de polimerización por hinchamiento en dos etapas y micrografía electrónica de un polímero de impresión molecular sintetizado por polimerización por hinchamiento en dos etapas (Pérez-Moral y col., 2004).

*Polimerización en los poros de partículas de sílice.*

Otro método para la obtención de partículas esféricas es la polimerización en el interior de partículas esféricas de sílice de tamaño conocido y posterior redisolución de las mismas. Este procedimiento consiste en la impregnación de las partículas de sílice con la disolución de polimerización. La principal dificultad de este método reside en el estricto control del volumen de disolución de polimerización empleado, ya que no debe ser superior al volumen total de los poros de las partículas de sílice. Un exceso de volumen provocaría la polimerización en el exterior de las partículas de sílice, así como la formación de agregados de partículas.

En la figura 21 se muestran las micrografías de las partículas de sílice y el polímero sintetizado en el interior de las mismas, una vez redisuelta la sílice. Tal y como puede apreciarse, el cuidadoso control del volumen de la disolución de polimerización permite obtener partículas de polímero de idéntica forma y tamaño a las partículas de sílice originales.

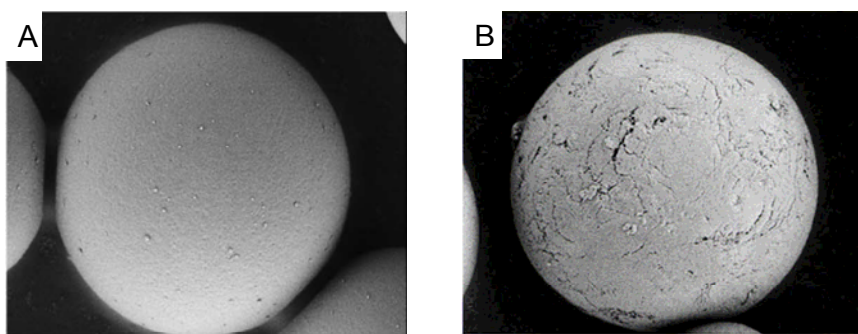


Figura 21. A. Partículas de sílice con polímero en los poros. B. Polímero después de eliminar las partículas de sílice (Tamayo y col., 2005)

El polímero formado se ha utilizado como fase estacionaria en cromatografía de líquidos para la determinación directa de fenilureas en extractos vegetales (Tamayo y col., 2005).

*Polimerización en superficie.*

En este método la superficie de un núcleo, como pueden ser esferas de sílice, barras de agitación (Zhu y col., 2008) o incluso micelas (Perez-Moral y col., 2004) se recubre de una capa de polímero por diferentes métodos que se describen a continuación. Es común referirse a las polimerizaciones en superficie con el término inglés “core-shell”. En la figura 22 se representa una micrografía de esferas de sílice recubiertas de polímero mediante la técnica de “grafting from” que se describe a continuación.

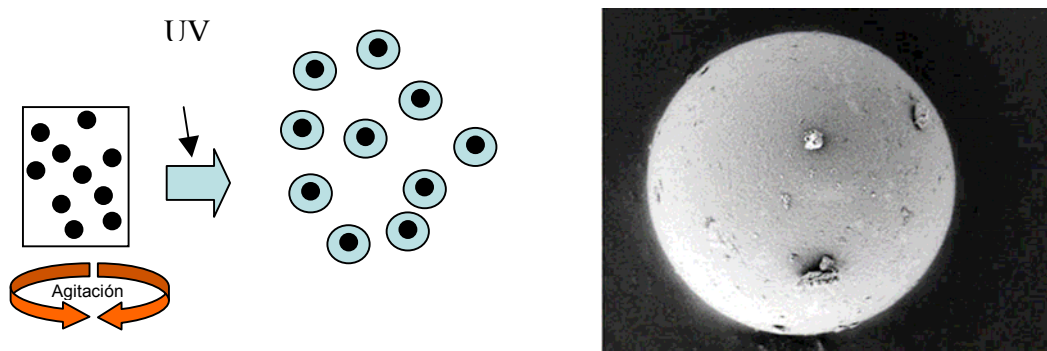


Figura 22. Proceso de polimerización en superficie y micrografía electrónica de un polímero de impresión molecular sintetizado sobre esferas de sílice (Tamayo y col., 2005)

Existen dos modalidades de polimerización en superficie.

“*Grafting to*”. En esta modalidad, se realiza la inmovilización de moléculas con enlaces polimerizables (monómeros) sobre la superficie en la que se va a realizar la polimerización. A continuación, la mezcla de polimerización (plantilla, entrecruzante, iniciador y disolvente) se pone en contacto con la superficie modificada y se produce la polimerización, dando lugar a la formación de una capa de MIP sobre la superficie de las partículas. Este sistema de polimerización ha sido empleado para la obtención de MIPs siguiendo tanto el modelo covalente como el no covalente. Esta metodología presenta sin embargo una gran dificultad a la hora de controlar el grosor de la capa polimérica formada y además la densidad máxima de polímero formado se ve limitada por factores estéricos y cinéticos.

“*Grafting from*”. Esta metodología surge con la intención de mejorar la transferencia de masa y capacidad de saturación de los polímeros preparados mediante la metodología anterior. En este caso, el compuesto inmovilizado sobre la superficie del material es el iniciador, de forma que el crecimiento de las cadenas poliméricas ocurre siempre desde la superficie del soporte, lo que permite un mayor control tanto del grosor de la capa de polímero formada como de su densidad. Los iniciadores pueden ser de tipo azoico (Shamsipur y col., 2007) o los denominados “*iniferter*” (Sellergren y col., 2002). Los “*iniferter*” son iniciadores radicálicos asimétricos que al fragmentarse se descomponen en dos radicales, uno capaz de iniciar la polimerización y otro que favorece la recombinación entre radicales dando lugar a la finalización de la polimerización. Por su naturaleza, los “*iniferter*” son los únicos iniciadores capaces de evitar la polimerización en el seno de la disolución, facilitando por tanto un control más estricto del grosor de la capa de polímero creada y una mejor transferencia de masa.

En la figura 23 aparece un esquema del proceso de polimerización en superficie utilizando *iniferter* como iniciador.

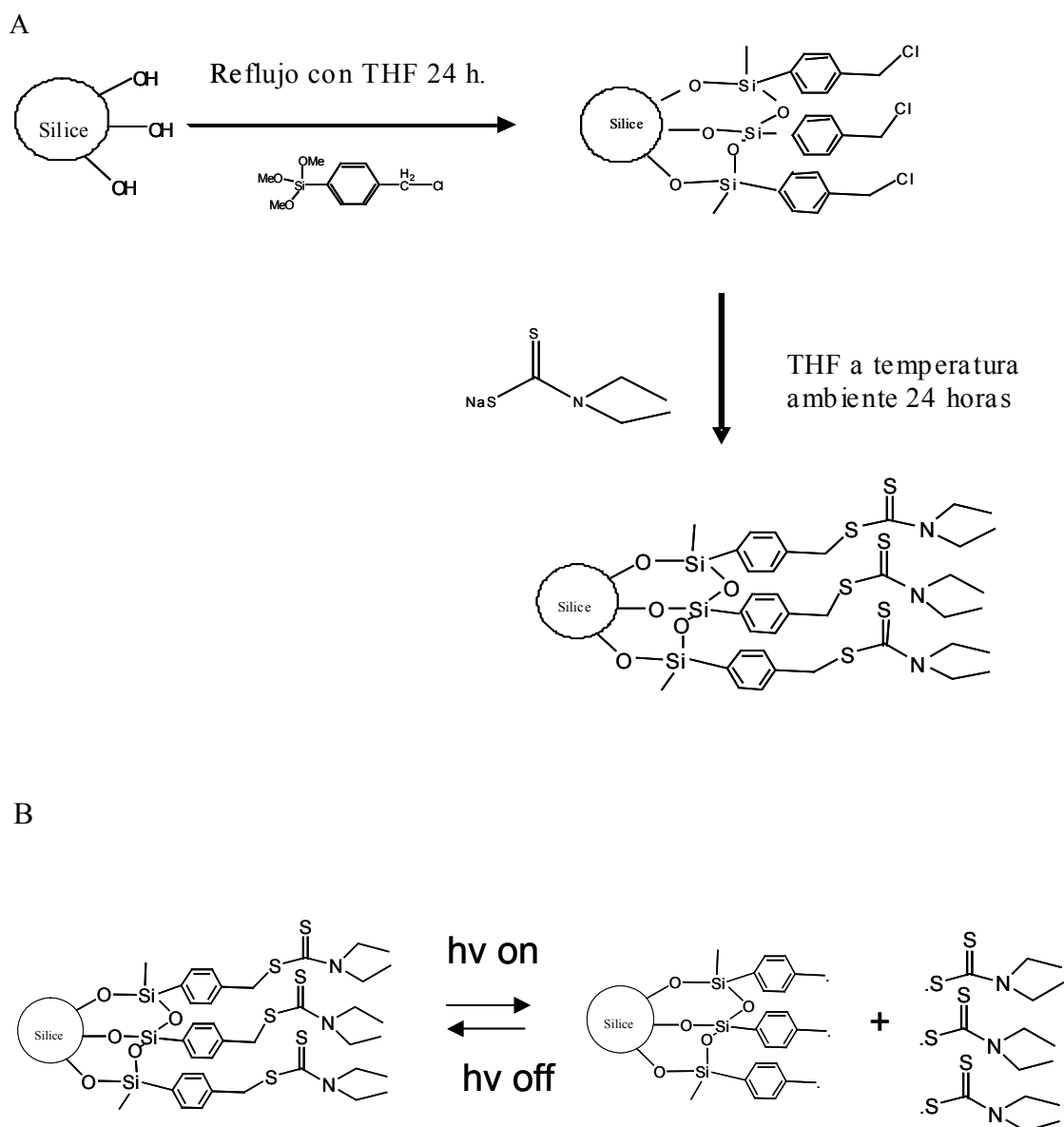


Figura 23. A. Inmovilización del “*iniferter*” en la superficie de la partícula de sílice. B. Descomposición del “*iniferter*” inmovilizado en la superficie de la partícula de sílice.

### 2.8.5. *Aplicaciones de los MIPs.*

A continuación se recogen algunas de las aplicaciones de los polímeros de impresión molecular.

*Separaciones analíticas.* Se basan en la utilización del polímero como fase estacionaria en cromatografía de líquidos o electrocromatografía capilar. Como se mencionó con anterioridad mediante el empleo de la polimerización por precipitación, el método de hinchamiento en dos etapas o las partículas de sílice para la síntesis del polímero se obtienen pequeñas esferas que son óptimas para esta función. Por lo general la síntesis covalente o semi-covalente proporciona una distribución más homogénea de los huecos en el polímero. Un ejemplo es la determinación de tiabendazol en extractos de frutas (Turiel y col., 2005), de fluoroquinolonas en extractos de suelo (Turiel y col., 2007) o de nortriptilina (NOR) en aguas (Khasawneh y col., 2001).

*Pseudo-Immunoensayos.* En 1993, Mosbach y sus colaboradores realizaron el primer ensayo en el cual un MIP sintetizado para el diazepam sustituyó a los anticuerpos en un inmunoensayo (Vlatakis y col., 1993). Por lo general si se comparan las constantes de afinidad de los compuestos orgánicos por los correspondientes anticuerpos o por los polímeros, ésta es mayor para los anticuerpos. Aunque poco a poco los avances que se están produciendo en el campo de los polímeros de impresión molecular están haciendo que esta diferencia haya ido disminuyendo, obteniéndose muy buenos resultados en cuanto a selectividad y sensibilidad para compuestos como morfina (Siemann y col., 1996) o propranolol (Andersson, 1996) entre otros.

*Sensores.* Se han desarrollado un gran número de sensores basados en MIPs para la detección de contaminantes medioambientales. La transducción de la señal se puede realizar bien por métodos ópticos, como la fluorescencia, electroquímicos o bien utilizando la balanza de cuarzo piezoeléctrica. La asociación del polímero y el transductor puede realizarse de diferentes maneras, por electropolimerización o por captura de las partículas de MIP en un gel o membrana que posteriormente se situarán en la superficie del electrodo.

Se han desarrollado numerosos sensores para la detección de contaminantes en muestras medioambientales, como la detección de paratió en muestras de arroz (Li y col., 2005) o atrazina en aguas subterráneas (Prasad y col., 2007), utilizando ambos detección electroquímica, TNT en aire utilizando en este caso detección óptica (Walker y col., 2007) al igual que digoxin en suero humano (González y col., 2009).

*Extracción en fase sólida (MISPE).* La utilización de los polímeros de impresión molecular como adsorbentes en la extracción en fase sólida, es posiblemente una de las mayores aplicaciones de estos materiales. A continuación se va a describir más ampliamente esta aplicación.

#### ***2.8.6. Extracción en fase sólida sobre polímeros de impresión molecular (MISPE) (Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction).***

El empleo de los MIPs como adsorbentes para la extracción en fase sólida (MISPE) es posiblemente la aplicación más extendida para estos materiales, ya que se consigue una extracción muy selectiva. En este sentido, la limpieza de los extractos es muy superior a las que se obtienen por métodos clásicos, al tratarse de adsorbentes diseñados específicamente para un compuesto o familia de compuestos determinado.

Una vez el polímero ha sido obtenido y lavado convenientemente, se trasvasa una pequeña cantidad del mismo (generalmente 50-200 mg) a una precolumna (extracciones en continuo) o a un cartucho (extracciones en discontinuo) sobre el cual se realizarán todas las etapas comunes a los procesos de extracción en fase sólida. En la figura 24 se representan las cuatro etapas implicadas en un proceso MISPE.

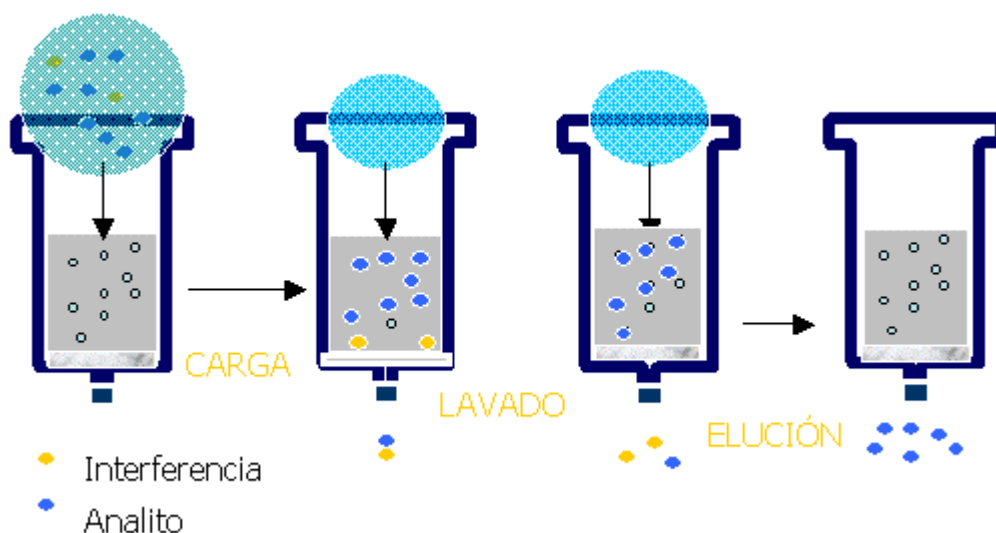


Figura 24. Etapas de extracción en fase sólida utilizando polímeros de impresión molecular.

Para llevar a cabo la evaluación del polímero, análogamente y en paralelo a la síntesis de MIP se prepara otro polímero de manera idéntica pero sin añadir el compuesto plantilla (NIP), de esta manera comparando, carga, lavado y elución en ambos polímeros se puede constatar la formación o no de los sitios de unión.

La primera etapa siempre será de acondicionamiento utilizando para ello el disolvente que será utilizado posteriormente en la etapa de carga. La elección del disolvente más adecuado para cada una de estas etapas debe hacerse basándose no sólo en la solubilidad de los analitos en los distintos disolventes empleados en cada una de las etapas, sino en el tipo de interacción implicada en la unión analito-polímero y en el porogen empleado durante la polimerización. El disolvente más adecuado para efectuar la carga de la muestra será aquél que favorezca la interacción entre los analitos y el polímero, siendo el porogen una primera aproximación a considerar. Por el contrario, el disolvente empleado en la elución se seleccionará en función de la facilidad para destruir la interacción específica entre los analitos y el MIP.

### 2.8.6.1. Optimización de un proceso MISPE.

#### *Carga.*

Atendiendo a los comentarios anteriores se podría decir que para los procesos de carga resultan apropiados todos aquellos disolventes de baja polaridad siempre y cuando el analito sea soluble en ellos. Así, teóricamente la retención del analito será mayor al aumentar la apolaridad del disolvente, ya que se van a favorecer la formación de los enlaces de hidrógeno con el monómero. A modo de ejemplo cabe destacar que los polímeros preparados en tolueno presentan un mayor reconocimiento del analito cuando la muestra se añade en tolueno que si ésta se adiciona en acetonitrilo. Sin embargo, en un estudio realizado por Spivak y col. en 1997, se observó que en los procesos de extracción sobre un polímero preparado en acetonitrilo, las recuperaciones eran mayores si el analito se añadía en acetonitrilo que si se hacía en cloroformo (disolvente más apolar). En estudios posteriores se ha podido confirmar esta tendencia de forma que de un modo general se puede decir que el mejor disolvente para realizar la carga es aquél en el que se ha llevado a cabo la polimerización, es decir, el porogen (Martín-Esteban y col., 2001).

Como se mencionó anteriormente, por lo general los procesos de síntesis se llevan a cabo en medios apolares como el tolueno o el cloroformo, ya que los disolventes polares (metanol, agua, etc) inhiben la formación del complejo plantilla:monómero y el inicio de la polimerización. Por tanto, la adición directa de muestras con un alto contenido en agua (fluidos biológicos, aguas medioambientales...) resulta inapropiada, ya que el reconocimiento molecular se va a ver desfavorecido o incluso completamente impedido. Sin embargo, cuando los analitos de interés son capaces de interactuar de manera no específica con la matriz polimérica, resulta posible su unión posterior a los sitios específicos si tras el proceso de carga se añade un disolvente adecuado.

*Lavado.*

En cuanto al lavado se utilizan disolventes de polaridad intermedia, con el fin de romper las interacciones no específicas con la matriz polimérica. No se deben utilizar disolventes muy polares ya que se podría producir también la ruptura de las interacciones específicas.

El método más eficaz para optimizar el lavado consiste en la comparación de recuperaciones obtenidas en el MIP con las obtenidas sobre el polímero no impreso (NIP). Al tratarse de un polímero sin huecos específicos, el tipo de unión que se puede dar al cargar los compuestos es siempre no específica. Así, en función de la etapa de lavado que se incluya (distintos disolventes y distintos volúmenes) se realiza un estudio de recuperaciones tanto en el MIP como en el NIP, intentando minimizar las recuperaciones en el caso del NIP sin afectar a la retención en el MIP. De esta manera se conseguiría demostrar la existencia de interacciones específicas entre los analitos en estudio y el polímero, descartando la posibilidad que las recuperaciones se deban a interacciones no específicas.

La cantidad de disolvente utilizado para la eliminación de las interacciones no específicas depende de la fortaleza de las mismas y del disolvente utilizado en la limpieza. Mientras que en algunos casos es posible la eliminación de estas interacciones con 1 o 2 ml del disolvente utilizado en la carga, en otros casos es preciso el uso de volúmenes superiores de un disolvente o mezcla de disolventes más polares. En general esta mezcla de disolventes suele estar formada por el disolvente utilizado en la carga y distintas proporciones de otro disolvente de una polaridad superior (Martín-Esteban y col., 2001; Cacho y col., 2003).

*Elución.*

Finalmente, como se ha mencionado previamente, la elución se realiza por lo general utilizando disolventes polares, próticos o mezcla de ambos. En algunos casos también se pueden utilizar pequeños porcentajes de ácidos débiles con el fin de romper las interacciones específicas por puentes de hidrógeno entre los compuestos en estudio y el polímero. Es importante mencionar que los cambios bruscos en la polaridad de los

disolventes utilizados puede provocar pérdida de selectividad en el polímero ya que se producen contracciones e hinchamientos del polímero, distorsionando los huecos específicos, por lo que es necesario hacer una elución utilizando disolventes con polaridad secuencial (Sellenger y col., 1990).

Otro problema que es posible encontrar a la hora de analizar los eluatos es la presencia de restos del compuesto plantilla utilizado para sintetizar el polímero (*leaking*). Es posible encontrarlo cuando el proceso de limpieza llevado a cabo con el Soxhlet no ha sido del todo eficaz, y no se ha eliminado la plantilla por completo. Es por ello que es posible tener recuperaciones engañosas en los primeros análisis cuando se determina el compuesto utilizado como plantilla.

Como se vio anteriormente, existe la posibilidad de utilizar otro compuesto de estructura y propiedades parecidas a las del compuesto o familia de compuestos que se desean analizar a la hora de sintetizar el MIP. De esta manera se eliminan estos problemas, sin embargo, no siempre es posible encontrar compuestos similares a los que se desean analizar.

#### 2.8.6.2. Aplicaciones MISPE.

Se han sintetizado numerosos polímeros para la extracción de distintos contaminantes o familias de los mismos presentes en muestras medioambientales como suelos, sedimentos, aire, agua o alimentos. Estos polímeros se han utilizado principalmente como adsorbentes en la extracción en fase sólida acoplados a otras técnicas analíticas que permiten la determinación de estos contaminantes. En la tabla 16 aparecen como ejemplo algunas de las numerosas aplicaciones de estos materiales utilizados en MISPE.

Tabla 16. Aplicaciones MISPE.

Analito estudiado	Compuesto Plantilla	Matrices	Monómero/ entrecruzante/ disolvente	Pretratamiento de la muestra	Ref.
Bisfenol A	Terbutilphenol	Aguas Superficiales	4-VP/EDMA/**	No	Kubo y col., 2003
Bisfenol A	Bisfenol A	Aguas Superficiales	4-VP /EDMA/tolueno+dodecanol	No	Ou y col., 2006
17- $\beta$ -estradiol	17- $\beta$ -estradiol	Aguas residuales	4-VP/EDMA/acetonitrilo	No	Le Noir y col., 2007
Fenilureas	Isoproturon	Aguas superficiales	MAA/EDMA/tolueno	SPE	Martín-Esteban y col., 2001 Carabias-Martínez y col., 2005
Monosulfuron	Monosulfuron	Suelo	MAA/EDMA/DMF	Extracción con disolventes	Dong y col., 2004
Nitrofenol	Nitrofenol	Agua de río	4-VP o MAA/EDMA/AcN	Acidificación	Masque y col., 2000

\*\* diferentes disolventes

Tabla 16. Aplicaciones MISPE (continuación).

<b>Analito estudiado</b>	<b>Compuesto Plantilla</b>	<b>Matrices</b>	<b>Monómero/ entrecruzante/ disolvente</b>	<b>Pretratamiento de la muestra</b>	<b>Ref.</b>
Triazinas	Terbutilazina	Aguas superficiales y sedimentos	MAA/EDMA/CH <sub>2</sub> CL <sub>2</sub>	Agua: No Sedimentos: extracción con Soxhlet (MeOH)	Ferrer y col., 2000
Melanina	Cyromazina	Leche y pienso	MAA/EDMA/MeOH-H <sub>2</sub> O (10-1)	Agitación y ultrasonidos.	He y col., 2009
Benzimidazol	Tiabendazol	Agua de pozo, grifo y río.	MAA/EDMA/AcN-Tol	Filtración, ajustar pH	Cacho y col., 2009

Como se observa en la tabla 16 en muchas ocasiones la extracción MISPE resulta altamente selectiva no siendo necesario ningún otro tratamiento adicional de la muestra. La selectividad que proporcionan los polímeros se aprecia claramente cuando se comparan los cromatogramas obtenidos antes y después del proceso MISPE. Como ejemplo, en la figura 25 se recoge esta comparación con cromatogramas obtenidos por LC-UV en el análisis de muestras de suelo enriquecidas con varias fluoroquinolonas.

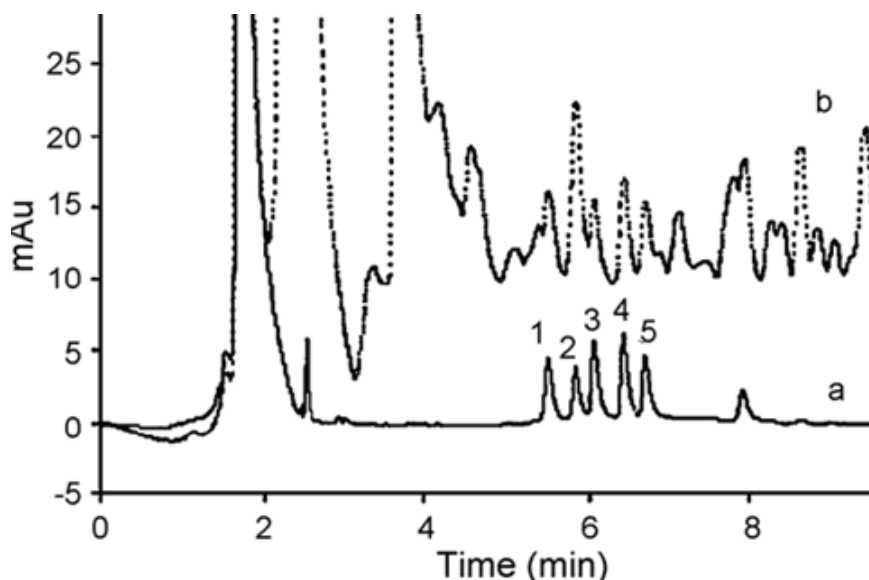


Figura 25. Cromatogramas obtenidos en el análisis de un extracto de suelo enriquecido con  $0.1 \mu\text{g g}^{-1}$  de una serie de fluoroquinolonas seleccionadas empleando (a) y sin emplear (b) la extracción en fase sólida con un MIP preparado para la ciproxacina (CIP). Picos: 1- enoxacin, 2- norfloxacin, 3- ciprofloxacina, 4- danofloxacina y 5- enrofloxacina. (Turiel y col., 2007)

La utilización de los polímeros de impresión molecular para el análisis de compuestos orgánicos directamente desde muestras acuosas siempre ha presentado una serie de dificultades, debido principalmente a que las interacciones entre plantilla-monomero están basadas en puentes de hidrógeno. Para solucionar este problema se suele realizar una extracción previa con un método convencional de extracción en fase sólida con el fin de cambiar los disolventes a unos más adecuados para la carga en el MIP. En ocasiones, se consigue eliminar algunas interferencias como ácidos húmicos o sales que podían afectar posteriormente a la selectividad de polímero (Figueiredo y col., 2007).

Entre las variables más importantes que pueden influir en la eficiencia de la extracción de los analitos en los polímeros destacan el pH y la fuerza iónica de la disolución acuosa. Un ejemplo del efecto del pH fue estudiado en la extracción de la atracina en muestras acuosas (Djozan y col., 2008). En este estudio mientras que en el NIP la eficiencia de la extracción es muy baja en todos los pH estudiados, en el MIP ésta aumenta obteniéndose los mejores resultados en el rango entre 4-9. Según los autores, esto se debe a que las uniones entre el monómero, MAA, y el analito, atracina, se producen por puentes de hidrógeno entre el grupo carboxílico del ácido y el hidrógeno del grupo amino y el nitrógeno de la molécula de atracina. A pHs inferiores a 4 la eficiencia de la extracción es baja porque tanto el grupo ácido del polímero como la atracina se encuentran en forma protonada mientras que a pHs superiores a 9 se encuentran ionizados.

En cuanto a la fuerza iónica de la disolución, los mismos autores comprobaron que la adición de NaCl en una disolución reguladora de fosfato (pH:7) aumentaba la eficiencia de la extracción. Al aumentar la fuerza iónica disminuía la solubilidad de los analitos y esto mejoraba la sensibilidad al aumentar la concentración de los analitos en la fase estacionaria.

A pesar de los problemas citados, cada vez aparecen un mayor número de aplicaciones de los MIPs en matrices acuosas sin ningún tipo de pretratamiento. Como se explicó anteriormente si durante la carga los analitos interactúan no específicamente con la matriz del polímero, mediante la adición de un disolvente adecuado es posible que estos analitos pasen a los huecos específicos obteniéndose así elevadas recuperaciones (Djozan y col., 2008). La determinación de sulfonatos en agua (Caro y col, 2004), ibuprofeno en orina y aguas residuales (Beltrán y col., 2007) o drogas como la cocaína o metadona en agua (Piletska y col., 2008) son algunos ejemplos de carga directa de matrices acuosas sobre el polímero en procesos MISPE.

Por último es necesario destacar la importancia que está adquiriendo en los últimos años la microextracción en fase sólida, ya que con ello se reduce el coste global en la fabricación del polímero. Concretamente la fabricación de fibras de MIPs ha dado muy buenos resultados en la extracción de distintos contaminantes tales como triazinas en suelos y alimentos (Turiel y col., 2007).

**2. 9. Bibliografía.**

- Albero, B.; Sánchez-Brunete, C.; Tadeo, J.L.; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, 51, 6915.
- Alexander, C.; Smith, C.R.; Whitcombe, M.J.; Vulfson, E.N.; *Journal of Americal Chemical Society*, **1999**, 121, 6640.
- Andersson, L.; *Analytical Chemistry*, **1996**, 68, 111.
- Andersson, L.I.; Sellergren, B.; Mosbach, B.; *Tetrahedron Letters*, **1984**, 25, 5211.
- Arshady, R.; Mosbach, K.; *Makromolecules Chemical*, **1981**, 182, 687.
- Baggiani, C.; Baravalle, P.; Anfonssi, L.; Tosí, C.; *Analytical Chimica Acta*, **2005**, 542, 125.
- Barked, S.A.; Long, A.R.; Short, C.R.; *Journal of Chromatography A*, **1989**, 475, 353.
- Baugros, J-B.; Giroud, B.; Dessalces, G.; Grenier-Loustalot, M-F.; Cren-Olive, C.; *Analytica Chimica Acta*, **2008**, 607, 191.
- Beltrán, A.; Caro, E.; Marce R.M.; Cormack, P.A.G.; Sherrington, D.C.; Borrull, F.; *Analytica Chimica Acta*, **2007**, 597, 6.
- Bruggemann, O.; Haupt, K.; Ye, L.; Yilmaz, E.; Mosbach, K.; *Journal of Chromatography A*, **2000**, 889, 15.
- Cacho C.; Turiel, E.; Martín-Esteban, A.; Perez Conde C.; *Journal of Chromatography B*, **2004**, 802, 347.
- Cacho C.; Turiel, E.; Martín-Esteban, A.; Perez Conde C.; *Journal of Chromatography A*, **2006**, 1114, 255.
- Cacho, C.; Turiel, E.; Perez-Conde, C.; *Talanta*, **2009**, 78, 1029.
- Cacho, C.; Turiel, E.; Martín-Esteban, A.; Pérez-Conde, C, Cámara, C.; *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2003**, 376, 491.
- Cámara, C.; Fernández, P.; Martín-Esteban, A.; Pérez-Conde, C.; Vidal, M. *Toma y Tratamiento de Muestras*. **2002**, Ed. Síntesis, Madrid.
- Camel, V.; *The Analyst*, **2001**, 126, 1182.
- Carabias-Martinez, R.; Rodríguez-Gonzalo, E.; Herrero-Hernández, E.; *Analytica Chimica Acta*, **2006**, 559, 186.

- Carabias-Martinez, R.; Rodríguez-Gonzalo, E.; Herrero-Hernández, E.; Díaz-García, M.E.; *Journal of Separation Science*, **2005**, *28*, 453.
- Caro, E.; Marce, R.M.; Cormack, P.A.G.; Sherrington, D.C.; Borrull, F.; *Journal of Chromatography A*, **2004**, *1047*, 175.
- Chapuis, F.; Mullot, J.-U; Pichón, V.; Tuffal, G.; Hennion, M.-C.; *Journal of Chromatography A*, **2006**, *1135*, 127.
- Damen, J.; Neckers, D.C.; *Journal of American Chemical Society*, **1980**, *102*, 3265.
- Daniel, S.; Prabhakara, P.; Prasada Rao, T.; *Analytica Chimica Acta*, **2005**, *536*, 197.
- Djozan, D.; Ebrahimi, B.; *Analytica Chimica Acta*, **2008**, *616*, 152.
- Dong, X.C.; Sun, H.; Lu, X.Y.; Wang, H.B.; Liu, S.X.; Wang, N.; *The Analyst*, **2002**, *127*, 1427.
- Dong, X.; Wang, N.; Wang, S.; Zhang, X.; Fan, Z.; *Journal of Chromatography A*, **2004**, *1057*, 97.
- Fernández-González, V.; Concha-Grana, E.; Muniategui-Lorenzo, S.; López-Mahía, P.; Prada-Rodríguez, D.; *Journal of Chromatography A*, **2008**, *1196*, 65.
- Ferrer, I; Lanza, F.; Tolokan, A.; Horvath, V.; Sellergren, B.; Horvai, G.; Barceló, D.; *Analytical Chemistry*, **2000**, *72*, 3934.
- Fidalgo-Used, N.; Blanco-González, E.; Sanz-Medel, A.; *Analytica Chimica Acta*, **2007**, *590*, 1.
- Figueiredo, E.C.; Tarley, C.R.T.; Kubuta, L.T.; Rath, S.; Arruda, M.A.Z.; *Microchemical Journal*, **2007**, *85*, 290.
- Gonzalez, G.P.; Hernando, P.F.; Alegría, J.S.D.; *Analytica Chimica Acta*, **2009**, *638*, 209.
- Guerrero-Sánchez, C.; Erdmenger, T.; Sereda, P.; Wouters, D.; Schubert, U.S.; *Chemistry-A European Journal*, **2006**, *12*, 9036.
- Haginaka, J.; Sagai, Y.; *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis*, **2000**, *22*, 899.
- Hallgren, P.; Westbom, R.; Nilsson, T.; Sporning, S.; Bjorklund, E.; *Chemosphere*, **2006**, *63*, 1532.
- Hartonen, K.; Parshintsev, J.; Sandberg, K.; Bergelin, E.; Nisula, L.; Riekkola, M.-L.; *Talanta*, **2007**, *74*, 32.

- He, L.; Su, Y.; Zheng, Y.; Huang, X.; Wu, L.; Liu, Y.; Zeng, Z.; Chen, Z. *Journal of Chromatography A*, **2009**, *1216*, 6196.
- Hiratani, H.; Alvarez-Lorenzo, C.; Chuang, J.; Guney, O.; Grosberg, A.Y.; Tanaka, T.; *Langmuir*, **2001**, *17*, 4431.
- Hong, S.; Albu, R.; Labbe, C.; Lasuye, T.; Stasik, B.; Riess, G.; *Polymer International*, **2006**, *55*, 1426.
- Hosoya, K.; Yoshizako, K.; Tanaka, N.; Kimata, K.; Araki, T.; Haginaka, J.; *Chemical Letters*, **1994**, 1437.
- Hyötyläinen, T.; *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2009**, *394*, 743.
- Ikegami, T.; Mukawa, T.; Nariai, H.; Takeuchi, T.; *Analytica Chimica Acta*, **2004**, *504*, 131.
- Kawaguchi, M.; Hayatsu, Y.; Nakata, H.; Ishii, Y.; Ito, R.; Saito, K.; Nakazawa, H.; *Analytica Chimica Acta*, **2005**, *539*, 83.
- Kempe, M.; *Analytical Chemistry*, **1996**, *68*, 1948.
- Kempe, M.; Fischer, L.; Mosbach, K.; *Journal of Molecular Recognition*, **1993**, *6*, 25.
- Kempe, M.; Mosbach, K.; *Journal of Chromatography A*, **1994**, *664*, 276.
- Khasawneh, M.A.; Vallano, P.T.; Remcho, V.T.; *Journal of Chromatography A*, **2001**, *922*, 87.
- Khuwijtjaru, P.; Chalooddong, K.; Adachi, S.; *Food Science and Technology Research*, **2008**, *14*, 1.
- Kristenson, E.M.; Ramos, L.; Brinkman, U.A. Th.; *Trends in Analytical Chemistry*, **2006**, *25*, 96.
- Kubo, T.; Hosoya, K.; Watabe, Y.; Ikegami, T.; Tanaka, N.; Sano, T.; Kaya, K.; *Journal of Chromatography A*, **2003**, *987*, 389.
- Kugimiya, A.; Takei, H.; *Analytica Chimica Acta*, **2008**, *606*, 252.
- Le Noir, M.; Plieva, F.; Hey, T.; Guieysse, B.; Mattiasson, B.; *Journal of Chromatography A*, **2007**, *1154*, 158.
- Li, C.; Wang, C.; Guan, B.; Zhang, Y.; Hu, S. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2005**, *107*, 411.
- Lin, J.C.; Arunkumar, R.; Liu, C.H.; *Journal of Chromatography A*, **1999**, *840*, 158.

- Maggioris, D.; Goulas, A.; Alexopoulos, A.H.; Chatzi, E.G.; Kiparissides, C.; *Chem. Engn. Sci.*, **2000**, *55*, 4611.
- Martín-Esteban, A.; Turiel, E.; Stevenson, D.; *Chromatographia*, **2001**, *53*, S434
- Marty, J.D.; Mauzac, M.; *Advances in Polymer Sciences*, **2005**, *172*, 1.
- Masque, N.; Marce, R.M.; Borrull, F.; Cormack, P.A.G.; Sherrington; D.C.; *Analytical Chemistry*, **2000**, *72*, 4122.
- Mathew, J.; Buchardt, O.; *Bioconjugate Chemistry*, **1995**, *6*, 524.
- Matsui, J.; Takeuchi, T.; *Analytical Communications*, **1997**, *34*, 199.
- Mayes, A.G.; Whitcombe, M.J.; *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2005**, *57*, 1742.
- Navarro-Villoslada, F.; Urraca, J.L.; Moreno-Bondi, M.C.; Orellana G.; *Sensors & Actuators B*, **2007**, *121*, 67.
- Ohkubo, K.; Sawakuma, K.; Sagawa, T.; *Polymer*, **2001**, *42*, 2263.
- Ou, J.; Hu, L.; Hu, L.; Li, X.; Zou, H.; *Talanta*, **2006**, *69*, 1001.
- Pérez-Moral, P.; Mayes, A.G.; *Analytica Chimica Acta*, **2004**, *6*, 15.
- Pedersen-Bejergaard, S.; Einar Rasmusen K.; Brekke, A.; Gronhaug Halvorsen, T.; *Journal of Separation Sciences*, **2005**, *28*, 1195.
- Piletska, E.V.; Guerreiro, A. R.; Romero-Guerra, M.; Chianella, I.; Turner, A. P. F.; Piletsky, S.A.; *Analytica Chimica Acta*, **2008**, *607*, 54.
- Piletsky, S.A.; Anderson, H.S.; Nicholls, I.A.; *Journal of Molecular Recognition*, **1998**, *11*, 94.
- Piletsky, S.A.; Matuschewski, H.; Schedler, U.; Wilpert, A.; Piletskaya, E.V.; Thiele, T.A.; Ulbrich, M.; *Macromolecules*, **2000**, *33*, 3092.
- Piletsky, S.A.; Turner A.P.F.; *Electroanalysis*, 2002, *14*, 317S.
- Prasad, K.; Prathish, K.P.; Gladis, J.M.; Naidu, G.R.K.; Rao, T.R.; *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2007**, *123*, 65.
- Ramström, O.; Anderson, L.I.; Mosbach, K.; *Journal of Organic Chemistry*, **1993**, *58*, 7562.
- Ramström, O.; Nicholls, I.A.; Mosbach, K.; *Tetrahedron: Asymmetry*, **1994**, *5*, 649.
- Sallacan, N.; Zayats, M.; Bourenko, T.; Kharitonov, A.B.; Willner, I.; *Analytical Chemistry*, **2002**, *74*, 702.

- Sambe, H.; Hoshina, K.; Haginaka, J.; *Journal of Chromatography A*, **2007**, *1152*, 130.
- Sambe, H.; Hoshina, K.; Moaddel, R.; Wainer, J.; Haginaka, J.; *Journal of Chromatography A*, **2006**, *1134*, 88.
- Sellergren, B.; *Trends in Analytical Chemistry*, **1999**, *18*, 164.
- Sellergren, B.; Andersson, L.I.; *Journal of Organic Chemistry*, **1990**, *55*, 3381.
- Sellergren, B.; Lepistö, M.; Mosbach, K.; *Journal of American Chemical Society*, **1988**, *110*, 5853.
- Sellergren, B.; Rückert, B.; Hall, A.J.; *Advance Materials*, **2002**, *14*, 1204.
- Sergeyeva, T.A.; Piletsky, S.A.; Brovko, A.A.; Slinchenko, E.A.; Sergeeva, L.M.; Elskaya, A.V.; *Analytica Chimica Acta*, **1999**, *392*, 105.
- Shamsipur, M.; Fasihi, J.; Ashtari, K.; *Analytical Chemistry*, **2007**, *79*, 7116.
- Shea, K.J.; Sasaki, D.Y.; *Journal of American Chemical Society*, **1989**, *111*, 3442.
- Shea, K.J.; Sasaki, D.Y.; *Journal of American Chemical Society*, **1991**, *113*, 4109.
- Shea, K.J.; Thompson, E.A.; Pandey, S.D.; *Journal of American Chemical Society*, **1980**, *102*, 3149.
- Shuting, W.; Mizaikoff, B.; *Biosensors & Bioelectronics*, **2007**, *23*, 201.
- Siemann, M.; Andersson, L.; Mosbach, K.; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1996**, *44*, 141.
- Sottani, C.; Turci, R.; Perbellini, L.; Minoia, C.; *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **1996**, *12*, 1063.
- Spivak, D.; Shea, K. *Journal of the American Chemical Society*, **1997**, *119*, 4388.
- Tamayo, F.G.; Casillas, J.L.; Martín-Esteban, A.; *Analytica Chimica Acta*, **2003**, *482*, 165.
- Tamayo, F.G.; Titirici, M.M.; Martín-Esteban, A.; Sellergren, B.; *Analytica Chimica Acta*, **2005**, *542*, 38.
- Turiel, E.; Martín-Esteban, A.; Tadeo, J.L.; *Journal of Chromatography A*, **2007**, *1172*, 97.
- Turiel, E.; Tadeo, J.L.; Cormack, P.A.G.; Martín-Esteban, A.; *The Analyst*, **2005**, *130*, 1601.
- Turiel, E. Tadeo, J.L.; Martín-Esteban, A.; *Analytical Chemistry*, **2007**, *79*, 3099.

- Tsukagoshi, K.; Yu, K.Y.; Maeda, M.; Takagi, M.; Miyajima, T.; *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, **1995**, *68*, 3095.
- Urraca, J.L.; Marazuela, M.D.; Merino, E.R.; Orellana, G.; Moreno-Bondi, M.C.; *Journal of Chromatography A*, **2006**, *1116*, 127.
- Vlatakis, G.; Andersson, L.; Müller, R.; Mosbach, K.; *Nature*, **1993**, *361*, 645.
- Walker, N.R.; Linman, M.J.; Timmers, M.M.; Dean, S.L.; Burkett, C.M.; Lloyd, J.A.; Keelor, J.D.; Baughman, B.M.; Edmiston, P.L.; *Analytica Chimica Acta*, **2007**, *593*, 82.
- Wang, J.; Cormack, P.A.G.; Sherrington, D.C.; Khoshdel, E.; *Angewandte Chemie*, **2003**, *115*, 5494.
- Watabe, Y.; Kubo, T.; Nishikawa, T.; Fujita, T.; Kaya, K.; Hosoya, K.; *Journal of Chromatography A*, **2006**, *1120*, 252.
- Whitcombe, M.J.; Rodriguex, M.E.; Villar, P.; Vulfsson, E.N.; *Journal of the American Chemical Society*, **1995**, *117*, 7105.
- Wu, A.H.; Syu, M.J.; *Biosensors and Bioelectronics*, **2006**, *21*, 2345.
- Wulff, G.; Sarhan, A.A.; *Angewandte Chemie International Edition in English* **1972**, *11*, 341.
- Wulff, G.; Schauhoff, S.; *Journal of Organic Chemistry*, **1991**, *56*, 395.
- Wulff, G.; Vietmeier, J.; Poll, H.G.; *Makromolekular Chemistry*, **1987**, *188*, 731.
- Wulff, G.; Wolf, G.; *Chemische Berichte*, **1986**, *119*, 1876.
- Yang, Y.; Boward, S.; Hawthorne, S.B.; Miller, D.J.; *Analytical Chemistry*, **1995**, *67*, 4571.
- Yang, Y.; Cajthaml, T.; Hofmann, T.; *Environmental Pollution*, **2008**, *156*, 745.
- Yu, C.; Ramström, O.; Mosbach, K.; *Analytical Letters*, **1997**, *30*, 2123
- Zhan, S.Z.; Dai, Q.; Yuan, C.W.; Lu, Z.H.; Haeussling, L.; *Analytical Letters*, **1999**, *32*, 677.
- Zhu, Q. J.; Tang, J.; Dai, J.; Gu, X.H.; Chen, S.W.; *Journal of Applied Polymer Science*, **2007**, *104*, 1551
- Zhu, X.; Zhu, Q.; *Journal of Applied Polymer Science*, **2008**, *10*, 2665.

### 3. REVISIÓN DE MÉTODOS

#### 3.1. Revisión de métodos empleados para la determinación de NP, 4-n-NP y NPEO<sub>x</sub> en muestras de interés ambiental.

Como se ha visto anteriormente, los nonilfenoles polietoxilados son compuestos utilizados mundialmente como surfactantes en detergentes, mientras que el nonilfenol y sus derivados etoxilados de cadena corta se utilizan para la fabricación de los polietoxilados. Debido a ello, hoy en día resulta posible encontrar altas concentraciones de estos compuestos en distintos compartimentos medioambientales, tales como aguas, sedimentos, suelos y muy especialmente en lodos procedentes de depuradora. A pesar de que la toxicidad de estos compuestos ha sido claramente demostrada, en la mayoría de los países no existe legislación con respecto a las concentraciones máximas permitidas. Únicamente el Working Document on Sludge 3<sup>rd</sup> Draft of the European Union aconseja una concentración límite de 50 mg kg<sup>-1</sup> de NP y NPEO<sub>x</sub> en lodos de uso agrícola (Working Document on Sludge, 2000). Algunos países como Suiza han seguido estas recomendaciones y han establecido la concentración máxima permitida en lodos agrícolas en 50 mg kg<sup>-1</sup>. En otros países como Dinamarca la restricción es aún mayor siendo de 10 mg kg<sup>-1</sup> el máximo permitido. Es de esperar que en futuro próximo las concentraciones encontradas de estos compuestos en el medio ambiente disminuyan ya que, desde el año 2003 existen restricciones en el mercado, en el uso y preparación de NP y NPEO<sub>x</sub> (Directiva 2003/53/EC).

A pesar de la ausencia de legislación, y debido a las evidencias en cuanto a su toxicidad, son varios los métodos que se han desarrollado para la determinación de nonilfenol y derivados etoxilados en las distintas matrices medioambientales (líquidas o sólidas). A continuación se describen los distintos tratamientos de muestra que se han desarrollado así como las técnicas analíticas empleadas para su determinación final.

### **3.1.1. Técnicas de extracción.**

#### 3.1.1.1. Muestras líquidas.

Los primeros trabajos que se pueden encontrar en la bibliografía dedicados al análisis de NP y derivados etoxilados en muestras acuosas hacen uso del procedimiento clásico de destilación desarrollado en 1977 por Veith y Kiwus (Veith y col., 1977). En este procedimiento se toman 2 litros de muestra, se ajusta el pH entre 7.0-7.5 y se añaden 20 g de NaCl, la muestra se calienta a reflujo durante 3 horas junto con 1-2 mL de ciclohexano para concentrar la muestra. Este tipo de destilación ha sido empleada con éxito para la extracción de NP y NPEO<sub>x</sub> en aguas residuales y de río (Giger y col., 1981; Ahel y col., 1985a). Sin embargo, esta técnica no es aplicable a la extracción de los derivados etoxilados de cadena larga, para los que las recuperaciones dejan de ser cuantitativas a partir del NPEO<sub>3</sub>. La causa fundamental es que al aumentar el número de grupos etoxilados disminuye la volatilidad y aumenta la solubilidad de los compuestos en la muestra (Ahel y col., 1993a y b).

Un problema similar es el que se da en análisis de derivados etoxilados del NP en muestras acuosas empleando extracción líquido-líquido. Debido a los bajos valores  $K_{ow}$  de los derivados etoxilados de cadena larga, la extracción líquido-líquido tanto en continuo como en discontinuo está muy desfavorecida para estos compuestos. Para conseguir recuperaciones cuantitativas varios autores han llevado a cabo una variante en la que se burbujea nitrógeno en la mezcla muestra acuosa/disolvente extractante para favorecer el reparto de los NPEO<sub>x</sub> de cadena larga a la fase orgánica. Este procedimiento se ha empleado con éxito para la determinación de APEO en aguas residuales (Ahel y col., 1985b; Scarlet y col., 1994; Ibrahim y col., 1996) con recuperaciones cuantitativas. En estos trabajos se emplea un volumen de aproximadamente 1 litro de muestra y volúmenes de etilacetato entre 60 y 100 mL. A pesar del burbujeo de nitrógeno, en todos los trabajos mencionados fue necesario realizar extracciones sucesivas. En un trabajo posterior, también Barco y col. en 2003 alcanzaron recuperaciones cuantitativas en la extracción de nonilfenoles polietoxilados de cadena larga en aguas residuales. Para ello realizaron dos extracciones sucesivas sobre 200 ml de cada muestra a pH 2 empleando 100 ml de una mezcla diclorometano / alcohol isopropílico (90/10) (Barco y col., 2003).

A excepción de los trabajos del párrafo anterior, el empleo de la extracción líquido-líquido se ha limitado al análisis del NP y los NPEO<sub>x</sub> de cadena corta ( $1 < x < 3$ ). Para estos compuestos sí resulta posible obtener recuperaciones cuantitativas de manera relativamente simple en matrices acuosas utilizando como disolvente extractante diclorometano (Wahlberg y col., 1990; Rudel y col., 1998; Romero y col., 2002). También la utilización de acetato de etilo ha permitido obtener recuperaciones cuantitativas para el 4-n-NP en muestras acuosas (Mol y col., 2000).

La extracción en fase sólida aparece como una alternativa a las técnicas descritas con anterioridad y presenta como ventaja principal frente a la extracción líquido-líquido el menor consumo de disolventes y evita la aparición de emulsiones. En los últimos años se han empleado distintas fases sólidas para la extracción de NP, 4-n-NP y NPEO<sub>x</sub> en muestras acuosas. Uno de los primeros adsorbentes utilizados, y que aún se utiliza para la extracción de surfactantes aniónicos (NPEO<sub>x</sub>) y los isómeros del nonilfenol, es la resina Amberlita XAD (2, -4, -8). Esta resina posee una gran capacidad de preconcentración para analitos apolares y moderadamente polares en muestras acuosas, obteniéndose recuperaciones superiores al 80% (Jones y col., 1978a y b; Xie y col., 2004). El problema que presenta este tipo de adsorbentes reside fundamentalmente en la necesidad de una purificación exhaustiva antes de su utilización. Por otra parte, por lo general, para eluir posteriormente los analitos suele ser necesario el empleo de Soxhlet, por lo que los tiempos de análisis son largos. Este mismo problema lo presentan los adsorbentes de carbón activo también utilizados para la extracción de NPEO<sub>x</sub> (Ventura y col., 1989) con la ventaja de poder utilizar grandes volúmenes de muestra. Como alternativa, el carbono grafitado presenta una mayor eficacia y además permite la elución secuencial de varias clases de surfactantes utilizando distintos disolventes (Di Corcia y col., 1994). Es una de las fases sólidas más utilizadas para la extracción de NP, 4-n-NP y sus derivados etoxilados tanto de cadena corta como de cadena larga en muestras de agua de río y aguas residuales, permitiendo obtener recuperaciones entre el 80% y el 107% dependiendo de compuesto y la muestra analizada (Ahel y col., 2000; Esperanza y col., 2004; Shao y col., 2002).

Posiblemente, y debido a su gran capacidad para retener tanto analitos polares como moderadamente apolares, la fase sólida más empleada para la extracción y preconcentración de NP, 4-n-NP y NPEO<sub>x</sub> en muestras acuosas sea la octadecil-sílice

(C<sub>18</sub>). Existen numerosos estudios en aguas de distinta procedencia en los que se obtienen muy buenas recuperaciones tanto para el NP como el NPEO<sub>x</sub> empleando este adsorbente (Lee y col., 1998; Gonzalez y col., 2004; Gatidou y col., 2007; Stasinakis y col., 2008). Sin embargo, las recuperaciones suelen ser menores en el caso del 4-n-NP al tratarse de un compuesto bastante apolar. Para el NP y otros miembros de la familia más apolares, el empleo de sílice como adsorbente permite mejorar las recuperaciones hasta un 80 % (Baugros y col., 2009).

Otro tipo de adsorbentes que también han sido empleados con éxito son los Waters Oasis HLB. Son cartuchos que presentan un relleno con un balance hidrofílico-lipofílico, (N-vinilpirrolidona (hidrofílica) y divinilbenceno (lipofílica)) y poseen una capacidad superior a la del C<sub>18</sub>. Se han utilizado en la extracción de NP en aguas de río, con recuperaciones superiores al 75% (Hibberd y col., 2009; Nie y col., 2009).

#### 3.1.1.2. Muestras sólidas.

Al igual que en el caso anterior, los primeros trabajos publicados sobre el análisis de NP y derivados en muestras sólidas describen métodos de extracción basados en procesos de destilación (Ahel y col., 1994a y b). Para ello se suspenden alícuotas de 10 a 50 g de muestra en 1.5 litros de agua y la extracción por destilación se lleva a cabo en corriente de vapor de agua durante un tiempo de 3 horas, obteniéndose buenas recuperaciones tanto para el NP como para los derivados etoxilados estudiados (x = 1, 2).

La mayoría de los métodos existentes para la determinación de NP y derivados en muestras sólidas hacen uso de las distintas técnicas de extracción sólido-líquido que se describieron en el capítulo anterior. Vilkesloe y col. (2002) emplearon un procedimiento de agitación simple con diclorometano para analizar los contenidos de NP y NPEO<sub>2</sub> en suelos sometidos a distintos tratamientos de fertilización. Aunque estos autores no proporcionan datos sobre la recuperación, la buena reproducibilidad del método de extracción les permitió realizar un estudio de la influencia de los tratamientos aplicados a los distintos suelos sobre los contenidos finales de estos contaminantes.

La extracción Soxhlet ha sido utilizada por varios autores para la extracción de NP, 4-n-NP y los derivados etoxilados tanto de cadena corta como larga en suelos, lodos y sedimentos (Shang y col., 1999a, Gibson y col., 2005, Fountoulakis y col., 2005). Como medios extractantes se han utilizado tanto disolventes puros como diclorometano o metanol, o mezclas de disolventes tipo hexano/acetona o hexano/propanol. Por lo general, las recuperaciones obtenidas han sido cuantitativas en todas las muestras y compuestos bajo estudio. Únicamente para los derivados etoxilados de cadena larga con más de 16 grupos etoxi, y en algún caso aislado para el 4-n-NP (Gadzala-Kopciuch y col., 2009) se obtuvieron recuperaciones inferiores al 65 %.

Como alternativas para la reducir el consumo de disolventes y tiempo de análisis que conlleva el Soxhlet, se han propuesto varios métodos empleando tanto los ultrasonidos como las microondas para favorecer la extracción. De hecho, son las técnicas de extracción sólido-líquido que más se han empleado para el análisis de NP y derivados en muestras sólidas medioambientales. En el trabajo mencionado anteriormente, Shang y col. (1999a) realizaron una comparación de resultados entre la extracción Soxhlet y la extracción asistida por ultrasonidos en muestras de sedimentos. La problemática observada para los derivados etoxilados de más de 16 unidades se mantenía en la extracción con ultrasonidos, aunque sí se observó un incremento en las recuperaciones. Para el NP y el resto de derivados etoxilados las recuperaciones obtenidas fueron cuantitativas con RSDs inferiores al 7 % en todos los casos. La extracción asistida por ultrasonidos también ha dado muy buenos resultados en muestras de lodos. Petrovic y col. desarrollaron un método de extracción de NP y NPEO<sub>x</sub> (x≈6) en lodos utilizando una mezcla metanol/diclorometano como disolvente extractante y obteniendo recuperaciones del 92 % para el NP y del 96 % para el NPEO<sub>x</sub> (Petrovic y col., 2000). Sin embargo otros autores que siguieron el mismo método no obtuvieron buenos resultados, siendo las recuperaciones obtenidas en lodos del 30% para el NP y del 38% para el NPEO<sub>2</sub> (Fountoulakis y col., 2005). Posteriormente Stasinakis y col. (2008) obtuvieron mejores resultados realizando la extracción de 4-n-NP y NPEO<sub>1</sub> y NPEO<sub>2</sub> con una mezcla metanol/agua a una temperatura de 50°C, con recuperaciones del 55 % para el primero y 78 y 104% para los dos restantes.

La extracción asistida con microondas ha demostrado ser más eficiente en algunos casos que la extracción asistida por ultrasonidos. En suelos y sedimentos, las

recuperaciones que se obtuvieron aplicando esta técnica al análisis de NP y los derivados mono y dietoxilado han sido siempre cuantitativas y con buena reproducibilidad (Croce y col., 2003, Cortazar y col., 2005). En el caso de las muestras de lodo, las recuperaciones obtenidas para el NP y los derivados etoxilados de cadena corta se ven incrementadas notablemente (91 % y 62% respectivamente) con respecto a la extracción asistida por ultrasonidos (Fountoulakis y col., 2005).

Para conseguir la extracción cuantitativa de los derivados etoxilados de cadena larga se ha de recurrir a la extracción con disolventes a alta presión (PLE) o a la extracción con fluidos supercrítico (SFE). Aunque en algunos trabajos las recuperaciones obtenidas no han sido cuantitativas para todos los derivados etoxilados (La Guardia y col., 2001), el PLE se ha empleado con éxito para la extracción de NP y NPEO<sub>x</sub> en sedimentos, lodos y compost. Utilizando como disolventes una mezcla de acetona/metanol se han alcanzado recuperaciones del 80.6 % para el NP (Reid y col., 2009), y con metanol, recuperaciones del 85% y 87% para el NP y el NPEO<sub>x</sub> x ~9-10 respectivamente (Valsecchi y col., 2001). En cuanto a la SFE, son pocos los trabajos publicados sobre la extracción de nonilfenoles polietoxilados. En uno de ellos se realiza la extracción de NPEO<sub>x</sub> en lodos y sedimentos utilizando el CO<sub>2</sub> como fluido supercrítico, y las recuperaciones obtenidas fueron cuantitativas (85-105%) para los compuestos etoxilados desde el monoetoxilado hasta el que presenta 17 grupos etoxi (Lee y col., 1997).

También existen algunos estudios enfocados al análisis de polvo ambiental. En el año 2003 Rudel y su grupo, realizaron un estudio del NP, NPEO<sub>1</sub> y NPEO<sub>2</sub> en el polvo acumulado en un aspirador. Para ello las muestras de polvo fueron aciduladas con 1 ml de ácido sulfúrico/agua (1/1) y se realizó la extracción con ultrasonidos durante 10 min utilizando tres porciones de 18 ml de diclorometano. Los extractos obtenidos fueron derivatizados con N, O-bis-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) a 60 °C durante 60 min. La determinación final de los compuestos se llevó a cabo mediante GC-MS (Rudel y col., 2003).

### 3.1.1.3. Muestras gaseosas.

La extracción y determinación de 4-NP, NPEO<sub>1</sub> y NPEO<sub>2</sub> procedentes de aire se ha llevado a cabo utilizando resinas de estireno-divinilbenceno (XDA-2) situadas en cartuchos entre dos capas de espuma de poliuretano (PUF). La extracción de los analitos de las resinas se realizó por agitación simple durante 10 min con tres porciones de 50 ml de diclorometano y los extractos obtenidos se concentraron a 1 ml con nitrógeno para su posterior derivatización con N, O-bis-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) a 60 °C durante 60 min. La determinación final de los compuestos se realizó mediante GC-MS (Rudel y col., 2003).

### 3.1.2. Técnicas de separación.

#### 3.1.2.1. Cromatografía de líquidos

La cromatografía de líquidos ha sido la técnica más empleada para la separación de nonilfenoles y sus derivados etoxilados, y especialmente para los derivados de cadena larga (poco volátiles). Debido al amplio rango de polaridad de estos compuestos son varios los tipos de columnas y las fases estacionarias que se han utilizado para su separación.

##### A. Fase Estacionaria. Sílice.

Las columnas de sílice son especialmente útiles para las separaciones de los nonilfenoles polietoxilados. El orden de elución depende del número de unidades etoxi que presenten, de manera que el tiempo de retención se incrementa al aumentar la longitud de la cadena etoxi. Otras columnas de fase normal muy empleadas son las de sílice modificadas con grupos amino (Shang y col., 1999a y b) y grupos ciano (Scarlett y col., 1994), aunque las separaciones obtenidas son mejores utilizando columnas modificadas con grupos amino. Por lo general como fase móvil para la separación de estos compuestos se utilizan gradientes con hexano, propanol y agua (Lee y col., 1999). La separación del NP o 4-n-NP de los derivados etoxilados utilizando este tipo de columna no se ha conseguido ya que coeluye con el nonilfenol monoetoxilado (Lee y col., 1997).

### B. Fase Estacionaria. C<sub>1</sub>

Aunque las columnas C<sub>1</sub> son consideradas como fase inversa, sus propiedades en cuanto hidrofobicidad son más parecidas a las columnas de fase normal que a una columna C<sub>18</sub>. Estas columnas también se han utilizado para la separación de nonilfenoles etoxilados de cadena larga (Scullion y col., 1996), siendo la eficacia de la separación dependiente del recubrimiento de carbono de la fase estacionaria C<sub>1</sub> (Willets y col., 2000).

### C. Fase Estacionaria. C<sub>8</sub>

Aunque la fase estacionaria C<sub>8</sub> es considerada como una fase inversa al igual que C<sub>18</sub>, al presentar una polaridad intermedia entre la sílice y la C<sub>18</sub>, es posible su utilización para la separación del NP y los derivados etoxilados de cadena larga. Sin embargo para los derivados etoxilados de cadena larga, aunque se consigue cierta separación, no es posible la identificación de los oligómeros, ya que todos ellos coeluyen en un mismo pico (Di Corcia y col., 1994).

### D. Fase Estacionaria: C<sub>18</sub>.

C<sub>18</sub> es la fase estacionaria por excelencia, la mayoría de las separaciones realizadas por HPLC, de cualquier conjunto de compuestos se realizan con este tipo de columnas. Es útil para la separación del NP o 4-n-NP de los derivados etoxilados de cadena corta (Fountoulakis y col., 2005), pero los NPEO<sub>x</sub> de cadena larga, por lo general eluyen en un solo pico, sin ser posible su identificación de manera individual (Valsecchi y col., 2001). Esto se debe a que al aumentar el número de grupos etoxi, las diferencias de polaridad disminuyen siendo imposible la separación de los derivados de cadena larga empleando la columna de C<sub>18</sub>.

#### 3.1.2.2. Cromatografía de gases.

La cromatografía de gases se ha empleado para la separación de NP, 4-n-NP y de los derivados etoxilados de hasta 6 unidades de grupo etoxi. Los derivados etoxilados de cadena más larga, no presentan la volatilidad adecuada para su

determinación por cromatografía de gases. Al contrario que en la cromatografía de líquidos en las que aparece un solo pico para el NP, en la cromatografía de gases, y debido a su alta resolución, aparecen varios picos pertenecientes a los distintos isómeros de cadena y de posición del NP. Zang y su grupo realizaron en el 2007 una identificación de estos isómeros (Zhang y col., 2007), y anteriormente Moeder y col. también habían utilizado el acoplamiento GC-GC para su estudio (Moeder y col., 2006).

En la mayoría de los trabajos publicados la determinación del NP y sus derivados por GC-MS o GC-MS/MS se realiza sin necesidad de derivatización (La Guardia y col., 2001; Vikelsoe y col., 2002; Lin y col., 1999; Gibson y col., 2005; Abad y col., 2005). Son pocos los trabajos en los que se hayan empleado agentes derivatizantes. Micic y col. emplearon mezclas de MSTFA/TMIS en distintas proporciones, en función del tipo de matriz estudiada, determinando la presencia de estos compuestos en sedimentos, materia sólida en suspensión y mejillones (Micic y col., 2009). Otro agente derivatizante utilizado para la determinación de 4-n-NP, NPEO<sub>1</sub> y NPEO<sub>2</sub> mediante GC-MS es una mezcla de N,O-bis(trimetilsilil)trifluoracetamida y piridina (Gatiduo y col., 2007) que también ha sido utilizada como agente derivatizante para la determinación de NP en agua y sedimentos por GC-MS/MS (Hibberd y col., 2009). La mezcla de N,O-bis(trimetilsilil)trifluoracetamida y trimetilcloro silano (BSTFA/TMCS) se ha utilizado también para la determinación de NP en aguas residuales por GC-MS/MS (Ballesteros y col., 2006).

### 3.1.2.3. Electroforesis capilar

Las técnicas de electroforesis capilar representan una alternativa a las técnicas anteriores ya que minimizan el consumo de disolventes y se consigue una alta eficiencia y selectividad en las separaciones. Algunos grupos como He y col. (1996) han conseguido la separación de los distintos isómeros de NP utilizando para ello la cromatografía electrocinética micelar (MEKC) con ciclodextrinas y utilizando como surfactante SDS. En este estudio se probaron dos tipos de ciclodextrinas, la  $\beta$ -CD, formada por 7 unidades de glucosa, y su derivado hidoxipropil- $\beta$ -CD, obteniéndose una mejor selectividad enantiomérica con este último. La resolución de los isómeros depende de la concentración de la ciclodextrina, con una concentración de 10 mM se

obtuvo la mejor resolución para la mayoría de los isómeros (He y col., 1996). Por otro lado, en el 2003, Regan y su grupo consiguieron la separación del NP de los derivados etoxilados de cadena corta (NPEO<sub>2</sub>) mediante MEKC (Regan y col., 2003) y más tarde en el año 2006 el grupo de Babay pudo separar algunos etoxilados de cadena más larga mediante el empleo de electroforesis capilar no acuosa, pero sin llegar a obtener una buena resolución (Babay y col., 2006).

#### 3.1.2.4. Inmunoensayos.

Existen algunos trabajos en los que se han utilizado inmunoensayos, ELISA, para la determinación de NP, y sus resultados son comparables a los obtenidos mediante LC-MS (Céspedes y col., 2006). Desde un punto de vista práctico, por lo general la utilización de ELISA con anticuerpos policlonales permite detectar cantidades totales de alquifenoles (NP y OP) (Mar'tinov y col., 2005) siendo por tanto más útiles a efectos de control medioambiental que los ELISA con anticuerpos monoclonales, que se utilizan fundamentalmente para la determinación de las especies lineales de los alquifenoles (Samsomova y col., 2001; Fránek y col., 2001).

#### 3.1.3. Detectores.

Los detectores más utilizados para la determinación de estos compuestos son fundamentalmente los detectores ultravioleta y de fluorescencia aunque la tendencia actual es el empleo del espectrómetro de masas dada su gran selectividad.

Entre los detectores de fluorescencia y de ultravioleta o DAD, son los primeros los que muestran una mayor selectividad por tratarse de compuestos aromáticos, por lo que son los más utilizados. Las longitudes de onda empleadas varían según los estudios, al utilizar el detector de fluorescencia se suelen emplear  $\lambda_{exc}$ : 222 y  $\lambda_{em}$ : 305 nm (Fountoulakis y col., 2005) mientras que para detectores de ultravioleta se fija la  $\lambda$  en 226 nm (Reid y col., 2009; Gadzala-Kopciuch y col., 2008).

Pero como se ha mencionado anteriormente, a pesar del mayor coste económico del espectrómetro de masas es la alternativa más selectiva, por lo que la mayoría de los artículos publicados para la determinación del NP, 4-n-NP y sus derivados etoxilados

utilizan detectores de masas o masas/masas tanto en cromatografía de líquidos (Shang y col., 1999; Petrovic y col., 2001) como de gases (La Guardia y col., 2001; Ballesteros y col., 2006; Loyo-Rosales y col., 2007; Aparicio y col., 2009) .

A modo de resumen de esta sección en la tabla 17 se recogen las técnicas utilizadas tanto para la extracción y determinación de los compuestos de la familia del nonilfenol así como las recuperaciones y los límites de detección obtenidos.

Tabla 17. Tabla resumen de métodos de determinación de NP, 4-n-NP y NPEO<sub>x</sub>

Compuesto	Matriz	Técnica de extracción	R%	Técnica de separación y determinación.	LD	Ref.
NP NPEO <sub>1-2</sub>	Aguas residuales	LLE (DCM)	66-107	GC-MS	0.01-0.02 µg l <sup>-1</sup> 0.064 µg l <sup>-1</sup>	Rudel y col., 1998
NP NPEO <sub>1</sub> NPEO <sub>2</sub>	Agua de río	SPE+GCB	105 99 107	NP-HPLC-FL	< 0.1 µg l <sup>-1</sup>	Ahel y col., 2000
4-n-NP	Agua superficial	LLE (etil acetato) + Derivatización MTBSTFA	> 90	GC-MS	6 ng l <sup>-1</sup>	Mol y col., 2000
NP NPEO <sub>1</sub> NPEO <sub>2</sub>	Agua del grifo y de río	LLE (DCM)	91-87 93-86 87-79	GC-MS	- - -	Romero y col., 2002
NP NPEO <sub>1</sub> NPEO <sub>2</sub> NPEO <sub>x</sub> 1≤x≤15	Agua residual	SPE (C <sub>18</sub> )	88 86 81 98	LC-MS	50 ng l <sup>-1</sup> 50 ng l <sup>-1</sup> 50 ng l <sup>-1</sup> 5 ng l <sup>-1</sup>	Gonzalez y col., 2004
NP NPEO <sub>1</sub> NPEO <sub>2</sub> NPEO <sub>x</sub> 3≤x≤15	Sedimento	PLE	89 92 94 97	LC-MS	1 µg kg <sup>-1</sup> 7 µg kg <sup>-1</sup> 4 µg kg <sup>-1</sup> 1 µg kg <sup>-1</sup>	Gonzalez y col., 2004
NP	Aguas residuales	SFE	85	LC-MS/MS	1 ng l <sup>-1</sup>	Petrovic y col., 2003
NP 4-n-NP	Distintas aguas	SPME + derivatización	> 90 > 90	GC-MS	1.58 – 3.85 ng l <sup>-1</sup>	Pan y col., 2008
NP	Lodos	SFE	100	GC-MS	-	Lin y col., 1999
NP NPEO <sub>1</sub> NPEO <sub>2</sub> NPEO <sub>x</sub> 3≤x≤15	Lodos	Ultrasonidos (DCM-MeOH)	73.5 75.9 77.8 78.1	LC-MS	5 µg kg <sup>-1</sup> 25 µg kg <sup>-1</sup> 10 µg kg <sup>-1</sup> 5 µg kg <sup>-1</sup>	Petrovic y col., 2001

Tabla 17. Tabla resumen de métodos de determinación de NP, 4-n-NP y NPEO<sub>x</sub> (continuación).

Compuesto	Matriz	Técnica de extracción	R%	Técnica de separación y determinación.	LD	Ref.
NP NPEO <sub>1,2</sub>	Lodos, Compost	PLE	62-110	GC-MS	-	La Guardia y col., 2001
NP	Lodos	PLE	81	LC-MS/MS	0.5 µg kg <sup>-1</sup>	Petrovic y col., 2003
NP	Lodos	Soxhlet	91	GC-MS	5.0 µg kg <sup>-1</sup>	Gibson, y col., 2005
NP NPEO <sub>1,2</sub>	Lodos	MAE	91.4 61.4	C <sub>18</sub> -HPLC-FL	2.86 µg g <sup>-1</sup> 1.82 µg g <sup>-1</sup>	Foutoulakis y col., 2005
4-n-NP NPEO <sub>1</sub> NPEO <sub>2</sub>	Lodos	Ultrasonidos + Derivatización (BSTFA)	60-100	GC-MS	0.04 µg g <sup>-1</sup> 0.49 µg g <sup>-1</sup> 0.96 µg g <sup>-1</sup>	Stasinakis y col., 2007
NP NPEO <sub>2</sub>	Suelo	Agitación	- -	GC-MS	-	Vikelsee y col., 2002
NP	Suelo	Soxhlet	75	GC-MS	1.0 µg kg <sup>-1</sup>	Gibson, y col., 2005
NP NPEO <sub>x</sub> 1≤x≤19	Sedimento	Soxhlet y ultrasonidos	84 52-104	NP-LC-MS	4 ng g <sup>-1</sup> 2-10 ng g <sup>-1</sup>	Shang y col., 1999a
NP NPEO <sub>x</sub> 1≤x≤19	Sedimento	PLE	65 93	NP-LC-MS	Pocos ng g <sup>-1</sup>	Shang y col., 1999b
NP NPEO <sub>x</sub> x~10	Sedimento	PLE	85 87	LC-FL	- -	Valsecchi y col., 2001
NP NPEO <sub>1</sub> NPEO <sub>x</sub> 3≤x≤15	Sedimento	High- temperature continuous-flow sonication (MeOH)	95 64 >100	Modo mixto-LC- MS	21.5 ng g <sup>-1</sup> 37.3 ng g <sup>-1</sup> 0.86-4.96 ng g <sup>-1</sup>	Ferguson, y col., 2001

### **3.2. Revisión de métodos empleados para la determinación de parabenos en muestras de interés ambiental.**

Los parabenos son compuestos cuyo estudio es relativamente reciente, por lo que la bibliografía sobre extracción y determinación de los mismos en matrices medioambientales no es muy abundante, apenas hay una quincena de artículos al respecto. En cambio si es posible encontrar numerosos artículos sobre su determinación en cosméticos (Wang y col., 1998; Labat y col., 2000; Borremans y col., 2003) y en menor medida en preparados farmacéuticos (Lokhnauth y col., 2005) o alimentos (Saad y col., 2005; Zhang y col., 2005).

No existe legislación relativa sobre las concentraciones máximas permitidas de estos compuestos en matrices medioambientales, únicamente existe legislación sobre su contenido en cosméticos, que ha de ser del 0,4 % de forma individual o del 0.8% de forma conjunta. Es por ello que no son muchos los métodos publicados hasta la fecha para la determinación de estos compuestos en el medio ambiente pero su posible toxicidad hace que su estudio sea de interés y vaya en aumento.

A continuación se recogen las técnicas de extracción, separación y determinación que se han empleado para la determinación de parabenos en muestras de interés ambiental.

#### **3.2.1. Técnicas de extracción.**

##### **3.2.1.1. Muestras líquidas.**

Los métodos desarrollados para muestras de aguas de río, aguas residuales, etc., se han basado fundamentalmente en procesos de extracción o microextracción en fase sólida. En el 2005, Lee y su equipo utilizaron como fase sólida cartuchos Oasis y el metanol como eluyente para la extracción del MeP, EtP, PrP y BuP de aguas residuales obteniéndose recuperaciones superiores al 87 % para todos los compuestos (Lee y col., 2005). Este procedimiento fue similar al llevado a cabo un año antes por Benijts y col. en aguas de río y residuales con la única diferencia del disolvente eluyente, que en este caso se trataba de una mezcla de metanol/alcohol isopropílico en relación 9/1. Al igual

que en trabajo posterior de Lee y col. las recuperaciones obtenidas fueron cuantitativas (Benijts y col., 2004).

Por otro lado, Canosa y su grupo en 2006 utilizaron la microextracción en fase sólida con fibra de poliacrilato (PA) durante 40 minutos para la extracción de MeP, EtP, PrP, BuP y BzP en aguas residuales obteniendo altas recuperaciones (Canosa y col., 2006). En este trabajo, se llevó a cabo la derivatización de los compuestos con N-metil-N-(tercbutildimetilsilil)trifluoracetamida (MTBSTFA) sobre la fibra favoreciéndose así su separación y determinación mediante GC-MS/MS. La derivatización sobre fibra es especialmente útil para los compuestos más polares, cuya derivatización en presencia de agua no es fácil. La desorción de los analitos en las fibras se llevó a cabo durante 3 min sin división de flujo. La principal ventaja que presentaba este método de microextracción en fase sólida con respecto a la extracción en fase sólida común es que prácticamente no utilizaba disolventes orgánicos.

Más recientemente, y al igual que en el trabajo citado anteriormente, Regueiro y sus colaboradores en el 2009 utilizaron la microextracción en fase sólida en espacio de cabeza empleando una fibra divinilbenceno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) para la extracción de parabenos y triclosano. En este trabajo se realizó la derivatización de los compuestos con anhídrido acético y la extracción se llevó a cabo a 100°C durante 15 minutos. Con este método se consiguió evitar el uso de disolventes orgánicos y se obtuvieron límites de cuantificación del orden de  $\text{pg ml}^{-1}$ , una buena precisión ( $\text{RSD} \leq 12\%$ ) y recuperaciones cuantitativas ( $\text{R} \geq 82\%$ ) (Regueiro y col., 2009a).

Este mismo grupo durante el año 2009 desarrolló un método combinado de microextracción líquido-líquido con ultrasonidos para la extracción de MeP, EtP, PrP, BuP y BzP, en aguas de río, residuales o procedentes de piscina. En este método, se depositaban 10 ml de muestra de agua junto con 0.1 g de hidrogeno fosfato sódico en tubos de centrifuga. Posteriormente, se añadían a cada muestra 1 ng de metilparaben deuterado y  $\text{C}_{13}$ -triclosano en metanol que actuaban como estándar surrogado, para finalmente adicionar a cada tubo 100  $\mu\text{l}$  de 1,1,1-tricloroetano con 2 ng de PCB-166 (standard interno) y 200  $\mu\text{l}$  de anhídrido acético como disolvente extractante y reactivo de derivatización, respectivamente. El tubo se introducía inmediatamente después en un

baño de ultrasonidos con una frecuencia de 40 kHz y una potencia de 100 W durante 5 min a 25°C .

Como resultado final se formaban emulsiones de 1,1,1-tricloroetano (fase dispersa) y agua (fase continua), las cuales se eliminaban mediante centrifugación y la fase orgánica que aparecía al final del tubo (100 µl) se recogía para su posterior análisis con GC-MS/MS. Este método presenta una serie de ventajas, como son su eficiencia, simplicidad, bajo coste y la posibilidad de analizar las muestras en menos de 20 min. Las recuperaciones obtenidas eran cuantitativas ( $R \geq 85\%$ ) y su precisión satisfactoria ( $RSD \leq 13\%$ ) (Regueiro y col., 2009b).

### 3.2.1.2. Muestras sólidas.

Son muy pocos los artículos en los que se han determinado parabenos en muestras sólidas medioambientales, en concreto sólo existe un artículo en el que se determina MeP, EtP, PrP y BzP junto con otros compuestos procedentes de cosméticos en lodos. En este trabajo realizado por Nieto y col. en el año 2009, utilizan la PLE como técnica de extracción. Las condiciones óptimas para la extracción fueron, temperatura de 100°C, presión de extracción de 140 bar, tiempo de calentamiento de 5 min y dos ciclos de 5 min con metanol seguidos de otros dos ciclos con una mezcla agua/metanol (1/1). Las recuperaciones obtenidas fueron superiores al 70% para los cuatro parabenos (Nieto y col., 2009).

También se han analizado muestras de polvo acumuladas en un aspirador para determinar la presencia y la concentración de MeP, EtP y BuP. El proceso de extracción llevado a cabo es el mismo que el descrito anteriormente para la familia del nonilfenol, ya que en el mismo estudio se analizaron ambas familias de compuestos (Rudel y col., 2003).

Más recientemente, Canosa y su grupo en el 2007 utilizaron la dispersión en matriz sólida (MSPD) como técnica para la extracción de MeP, EtP, PrP y BuP en polvo. El proceso a seguir fue el siguiente, para mejorar la interacción entre los analitos y el disolvente extractante en un principio se secaron muestras de 0.5 g de polvo procedente de distintas casas con 0.5 g de sulfato sódico anhidro. Seguidamente, con la

ayuda de un mortero, se dispersó la muestra en 1,25 g de C<sub>18</sub> hasta obtener una mezcla homogénea. Posteriormente, la mezcla se transfirió a un cartucho de extracción en fase sólida que contenía 2 g de Florisil. Finalmente, los cartuchos se lavaron con 10 ml de diclorometano para eluir los compuestos orgánicos con una polaridad menor que los analitos y posteriormente con 10 ml de acetonitrilo para eluir de forma cuantitativa los parabenos en estudio (Canosa y col., 2007).

### 3.1.1.3. Muestras gaseosas.

En un estudio realizado por Rudel y col. (2003), se analizaron muestras de aire para determinar MeP, EtP y BuP, entre otros compuestos. El proceso de extracción seguido fue el mismo que se detalló anteriormente para el NP, NPEO<sub>1</sub> y NPEO<sub>2</sub> y las recuperaciones obtenidas para los compuestos en estudio se situaron en el rango entre 60 y 150%, aunque en el estudio no se especifica las recuperaciones para cada uno de los compuestos.

## 3.2.2. *Técnicas de separación.*

### 3.2.2.1. Cromatografía de líquidos

No son muchos los trabajos en los que la separación y determinación de estos compuestos en muestras ambientales se realice mediante cromatografía líquida. El mayor problema reside en las bajas concentraciones en las que se encuentran dichos compuestos, por lo que se requieren detectores muy sensibles o tratamientos de muestra muy exhaustivos. Por otro lado en la familia de los parabenos existen algunos isómeros que es necesario separar correctamente para posteriormente cuantificar, tanto si se utiliza detectores de masas como ultravioleta. Existen algunos artículos en los que se utiliza LC-MS/MS para la separación y determinación de compuestos de la familia de los parabenos obteniéndose límites de detección de acuerdo con los valores encontrados en muestras reales. Benijts y su grupo utilizaron LC-MS/MS para la separación y determinación de MeP, EtP, PrP y BzP en distintos tipos de agua, para ello utilizaron una columna C<sub>18</sub> (100 x 2 mm, 3 μm) usando la ionización en modo negativo y un gradiente con 1 mM de formiato amónico en una mezcla de agua/acetonitrilo (80/20, v/v), siendo el tiempo total de análisis de 35 min (Benijts y col., 2004).

Lee y col. también utilizaron la cromatografía líquida para la separación de MeP, EtP, PrP y BzP y al igual que Benijts utilizaron una columna C<sub>18</sub> de 5 μm, utilizando un gradiente con fase móvil binaria de metanol y agua y flujo variable (0.9 a 1.25 ml min<sup>-1</sup>). Con este método se consiguió la separación de estos compuestos en menos de 15 min (Lee y col., 2006).

Por otro lado, Nieto y su grupo utilizaron como técnica de separación de MeP, EtP, PrP, BzP la cromatografía líquida rápida de alta resolución (UHPLC), este tipo de cromatografía utiliza columnas empaquetadas con partículas de tamaño de 1.8 μm y presenta como ventajas en comparación con el HPLC convencional un incremento de la velocidad y una mejora de la sensibilidad, selectividad y eficacia. En este trabajo la separación se consiguió en menos de 10 min empleando una columna Zorbax (5.0 cm x 0.46 cm) con tamaño de partícula de 1.8 μm, un flujo de 0.6 ml min<sup>-1</sup>, y una fase móvil binaria con agua Milli-Q acidulada con ácido acético hasta pH:3 y metanol (Nieto y col., 2009).

### 3.1.2.2. Cromatografía de gases.

Se trata de la técnica más empleada para la determinación de estos compuestos, ya que su acoplamiento con un espectrómetro de masas la convierte en una técnica muy sensible, pudiendo alcanzar límites de detección del orden de ppb o ppt, sin necesidad de realizar tratamientos de muestra muy exhaustivos (Canosa y col, 2006; Regueiro y col., 2009a y b). Aunque como desventaja principal presenta la necesidad del uso de la derivatización de estos analitos para mejorar su separación y determinación mediante GC-MS/MS o GC-MS. Alguno de los derivatizantes utilizados para el MeP, EtP, PrP y BuP han sido el ácido pentafluoropropionico (PFPA) (Lee y col., 2005), la N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) (Rudel y col., 2003), anhídrido acético (Regueiro y col., 2009b) o la N-metil-N-(tert-butildimetilsilil)trifluoroacetamida (Canosa y col., 2009). En la figura 26 aparece un esquema típico de la derivatización de los parabenos con BSTFA y PFPA.

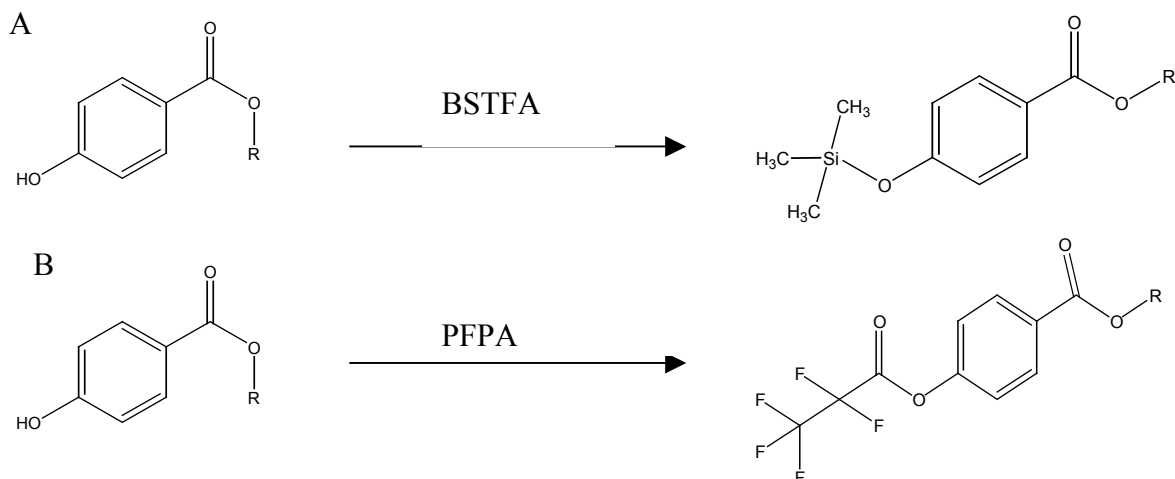


Figura 26. Derivatización de los parabenos con A. BSTFA y B. PFPA.

### 3.2.2.3. Electroforesis capilar

En varios artículos publicados en 2008 y 2009 por Blanco y su grupo, se utilizó la electroforesis capilar no acuosa (NACE) acoplada a un diodo array para la separación y determinación de MeP, EtP, PrP, BuP y BzP en muestras acuosas. En un primer método se utilizó un capilar con una longitud efectiva de 61.5 cm y un diámetro interno de 75  $\mu\text{m}$ . Las muestras se inyectaban hidrodinamicamente durante 5 s y el voltaje aplicado para la separación fue de  $-30$  kV. Como electrolito de fondo se utilizó 20 mM Tris y 52 mM de hidróxido sódico preparado en metanol a un pH de 12.2.

Este mismo grupo publicó una variación de este método enfocada a lograr una mejor sensibilidad. Para ello llevaron a cabo procesos de *stacking* con polaridad inversa que permitió incrementar el tiempo de inyección de 5 a 60 s. El empleo de esta última técnica reducía en aproximadamente un orden de magnitud los límites de cuantificación obtenidos con inyecciones de 5 s (Blanco y col., 2008; Blanco y col., 2009).

### 3.1.3. Detectores.

Como se ha comentado al hablar de las técnicas utilizadas para la separación de estos compuestos, debido a las bajas concentraciones en las que se encuentran es necesario la utilización de detectores que presenten una alta selectividad y sensibilidad.

La mayoría de los artículos publicados utilizan como detector el espectrómetro de masas o masas-masas en tándem acoplado fundamentalmente a cromatógrafos de gases (Regueiro y col., 2009a; Canosa y col., 2006; Regueiro y col., 2009b; Canosa y col., 2007) y en mucha menor medida con cromatografía de líquidos (Benijts, y col., 2004; Nieto y col., 2009).

También se ha utilizado el diodo array como detector, pero siempre acoplado a técnicas electroforéticas (Blanco y col., 2008; Blanco y col., 2009).

La tabla 18 recoge un resumen de los métodos empleados para la determinación de distintos parabenos en muestras de interés medioambiental.

Tabla 18. Tabla resumen de métodos de determinación de parabenos.

Compuesto	Matriz	Extracción	%R	Determinación	LD	Ref.
MeP EtP PropP ButP	Agua residual, de río y de piscina.	SPME + derivatización (MTBSTFA)	n.c 86 91 85	GC-MSMS	17 pg ml <sup>-1</sup> 8.8 pg ml <sup>-1</sup> 4.0 pg ml <sup>-1</sup> 5.7 pg ml <sup>-1</sup>	Regueiro y col., 2009a
MeP EtP PropP ButP BzP	Agua residual	SPME + derivatización (MTBSTFA)	≥ 87	GC-MSMS	*0.025 ng ml <sup>-1</sup> *0.005 ng ml <sup>-1</sup> *0.002 ng ml <sup>-1</sup> *0.001 ng ml <sup>-1</sup> *0.005 ng ml <sup>-1</sup>	Canosa y col., 2006
MeP EtP PropP ButP	Agua residual	pH:3 SPE (Oasis) Elución: MeOH Derivatización (PFPA).	87 92 96 99	GC/MS	0.01 µg l <sup>-1</sup> 0.01 µg l <sup>-1</sup> 0.01 µg l <sup>-1</sup> 0.01 µg l <sup>-1</sup>	Lee y col., 2005
MeP EtP PropP	Agua residual y agua de río	SPE (Oasis HLB) Elución: MTBE/iPrOH (9/1)	99.3 91.1 91.5	LC/MS/MS	0.2 ng l <sup>-1</sup> 0.5 ng l <sup>-1</sup> 0.2 ng l <sup>-1</sup>	Benijts, y col., 2004

\*LC

Tabla 18. Tabla resumen métodos de determinación de parabenos (continuación).

Compuesto	Matriz	Extracción	%R	Determinación	LD	Ref.
MeP EtP PropP BzP	Agua residual	SFE (C <sub>18</sub> )	- - - -	GC-MS	- - - -	Paxéus, 1995
MeP EtP PropP ButP BzP	Agua corriente, de río y residual	SPE (Oasis)	99-108 98-102 97-107 99-102 97-102	NACE-DAD	15 ng ml <sup>-1</sup> 13 ng ml <sup>-1</sup> 16 ng ml <sup>-1</sup> 18 ng ml <sup>-1</sup> 13 ng ml <sup>-1</sup>	Blanco y col., 2008
MeP EtP PropP ButP BzP	Agua corriente, de río y residual	SPE (Oasis)	99-108 98-102 97-107 99-102 97-102	LVSS -NACE-DAD	*0.20 ng ml <sup>-1</sup> *0.17 ng ml <sup>-1</sup> *0.21 ng ml <sup>-1</sup> *0.25 ng ml <sup>-1</sup> *0.18 ng ml <sup>-1</sup>	Blanco y col., 2009
MeP EtP PropP ButP	Agua residual, de río y de piscina.	Microextracción con ultrasonidos + derivatización por acetilación	n.c. 85 92 87	GC-MS/MS	16.4 pg ml <sup>-1</sup> 12.5 pg ml <sup>-1</sup> 7.7 pg ml <sup>-1</sup> 3.9 pg ml <sup>-1</sup>	Regueiro y col, 2009b
MeP EtP PrP BuP	Polvo interior	MSPD C <sub>18</sub> dispersante Florilil adsorbente	114 87 93 80	GC-MS/MS	*1.3 ng g <sup>-1</sup> *2.6 ng g <sup>-1</sup> *0.6 ng g <sup>-1</sup> *0.7 ng g <sup>-1</sup>	Canosa y col., 2007
MeP EtP BuP	Polvo	Extracción asistida por ultrasonidos (DCM) + Derivatización (BSTFA)	- - -	GC-MS	0.3 µg g <sup>-1</sup> 0.2 µg g <sup>-1</sup> 0.2 µg g <sup>-1</sup>	Rudel y col., 2003
MeP EtP BuP	Aire	PUF/XAD-2 + Derivatización (BSTFA)	- - -	GC-MS	1 ng m <sup>3</sup> 1 ng m <sup>3</sup> 4 ng m <sup>3</sup>	Rudel y col., 2003
MeP EtP PropP BzP	Lodo	PLE	72 80 102 106	UHPLC-MS/MS	3 µg kg <sup>-1</sup> 1.75 µg kg <sup>-1</sup> 1.75 µg kg <sup>-1</sup> 3 µg kg <sup>-1</sup>	Nieto y col., 2009

\*LC

### 3.3. Bibliografía

- Abad, E.; Martínez, K.; Planas, C.; Palacios, O.; Caixach, J.; Rivera, J.; *Chemosphere*, **2005**, *61*, 1358.
- Ahel, M.; Giger, W.; *Analytical Chemistry*, **1985a**, *57*, 1577.
- Ahel, M.; Giger, W.; *Analytical Chemistry*, **1985b**, *57*, 2584.
- Ahel, M.; Giger, W.; *Chemosphere*, **1993a**, *26*, 1461.
- Ahel, M.; Giger, W.; *Chemosphere*, **1993b**, *26*, 1471.
- Ahel, M.; Giger, W.; Koch, M.; *Water Research*, **1994a**, *28*, 1131.
- Ahel, M.; Giger, W.; Schaffner, C.; *Water Research*, **1994b**, *28*, 1143.
- Ahel, M.; Giger, W.; Molnar, E.; Ibric, S.; *Croatica Chemica Acta*, **2000**, *73*, 209.
- Aparicio, I.; Santos, J.L.; Alonso, E.; *Waste Management*, **2009**, *29*, 1747.
- Babay, P.A.; Gestar, R. T.; Silva, M.F.; Thiele, B.; Batistoni, D.A.; *Journal of Chromatography A*, **2006**, *1116*, 277.
- Ballesteros, O.; Zafra, A.; Navalón, A.; Vilchez, J.L.; *Journal of Chromatography A*, **2006**, *1121*, 154.
- Benijts, T.; Lambert, W.; De Leenheer, A.; *Analytical Chemistry*, **2004**, *76*, 704.
- Blanco, E.; Casais, M.C.; Mejuto, M.C.; Cela, R.; *Analytica Chimica Acta*, **2009**, *647*, 104.
- Blanco, E.; Casais, M.C.; Mejuto, M.C.; Cela, R.; *Electrophoresis*, **2008**, *29*, 3229.
- Barco, M.; Planas, C.; Palacios, O.; Ventura, F.; Rivera, J.; Caixach, J.; *Analytical Chemistry*, **2003**, *75*, 5129.
- Borremans, M.; Van Looc, J.; Roos, P.; Goeyens, L.; *Chromatographia*, **2003**, *58*, 1.
- Canosa, P.; Rodríguez, I.; Rubí, E.; Bollaín, M.H.; Cela, R.; *Journal of Chromatography A*, **2006**, *1124*, 3.
- Canosa, P.; Rodríguez, I.; Rubí, E.; Cela, R.; *Analytical Chemistry*, **2007**, *79*, 1675.
- Céspedes, R.; Skryjová, K.; Raková, M.; Zeravik, J.; Fránek, M.; Lacorte, S.; Barceló, D.; *Talanta*, **2006**, *70*, 745.

- Cortazar, E.; Bartolomé, L.; Delgado, A.; Etxebarria, N.; Fernández, L.A.; Usobiaga, A.; Zuloaga, O.; *Analytica Chimica Acta*, **2005**, 534, 247.
- Croce, V.; Patrolecco, L.; Rolesello, S.; Valscechi, *Chromatographia*, **2003**, 58, 145.
- Díaz, A.; Ventura, F.; Galceran, M.T.; *Journal of Chromatography A*, **2002**, 963, 159.
- Di Corcia, A.; Samperi, R.; Marcomini, A.; *Environmental Science and Technology*, **1994**, 28, 850.
- Directiva 2003/53/EC del Parlamento Europeo, junio **2003**.
- Esperanza, M.; Suidan, M.T.; Nishimura, F.; Wang, Z-M.; Sorial, G.A.; Zafiro, A.; McCauley, P.; Brenner, R.; Sayles, G.; *Environmental Science and Technology*, **2004**, 38, 3028.
- Ferguson, P.L.; Iden, C.R.; Brownawell, B.J.; *Journal of Chromatography A*, **2001**, 938, 79.
- Fountoulakis, M.; Drillia, P.; Pakou, C.; Kampioti, A.; Stamatelatu, K.; Lyberatos, G.; *Journal of Chromatography A*, **2005**, 1089, 45.
- Fránek, M.; Zeravik, J.; Eremin, S.A.; Yakovleva, J.; Badea, M.; Danet, A.; Nistor, C.; Ocio, N.; Emneus, J.; *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **2001**, 371, 456.
- Gadzala-Kopciuch, R.; Filipiak, A.; Berecka, B.; Gomulka, P.; Buszewski, B.; *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **2009**, 32, 971.
- Gadzala-Kopciuch, R.; Filipiak, A.; Berecka, B.; Buszewski, B.; *Talanta*, **2008**, 74, 655.
- Gatidou, G.; Thomaidis, N.S.; Stasinakis, A.; Lekkas, T.D.; *Journal of Chromatography A*, **2007**, 1138, 32..
- Gibson, R.; Wang, M-J.; Padgett, E.; Beck, A.J.; *Chemosphere*, **2005**, 61, 1336.
- Giger, W.; Stephanou, E.; Schaffner, C.; *Chemosphere*, **1981**, 10, 1253.
- González, S.; Petrovic, M.; Barceló, D.; *Journal of Chromatography A*, **2004**, 1052, 111.
- He, Y.; Lee, H.K.; *Journal of Chromatography A*, **1996**, 749, 227.
- Hibberd, A.; Maskaoui, K.; Zhang, Z.; Zhou, J.L.; *Talanta*, **2009**, 77, 1315.
- Ibrahim, N.M.A.; Wheals, B.B.; *Analyst*, **1996**, 121, 239.
- Jones, P.; Nickless, G.; *Journal of Chromatography A*, **1978a**, 156, 87.

- Jones, P.; Nickless, G.; *Journal of Chromatography A*, **1978b**, 156, 99.
- Labat, L.; Kummer, E.; Dallet, P.; Dubost, J.P.; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2000**, 23, 763.
- La Guardia, M.J.; Hale, R.C.; Harvey, E.; Mainor, T.M.; *Environmental Science and Technology*, **2001**, 35, 4798.
- Lee, H-B.; *Water Quality Research Journal of Canada*, **1999**, 34, 3.
- Lee, H-B.; Peart, T.E.; Bennie, D.T.; Maguire, R.J.; *Journal of Chromatography A*, **1997**, 785, 385.
- Lee, H-B.; Peart, T.E.; Svoboda, M.L.; *Journal of Chromatography A*, **2005**, 1094, 122.
- Lee, H-B.; Weng, J.; Peart, T.E.; Maguire, R.J.; *Water Quality Research Journal of Canada*, **1998**, 33, 19.
- Lee, M.R.; Lin, C.Y.; Li, Z.G.; Tsai, T.F.; *Journal of Chromatography A*, **2006**, 1120, 244.
- Lin, J-G.; Arunkumar, R.; Liu, C-H.; *Journal of Chromatography A*, **1999**, 840, 71.
- Lokhnauth, J.K.; Snow, N.H.; *Analytical Chemistry*, **2005**, 77, 5938.
- Loyo-Rosales, J.E.; Rice, C.P.; Torrents, A.; *Chemosphere*, **2007**, 68, 2118.
- Mart'ianov, A.A.; Dzantiev, B.B.; Zherdev, A.V.; Aeremin, S.; Céspedes, R.; Petrovic, M.; Barceló, D.; *Talanta*, **2005**, 65, 367.
- Micic, V.; Hofmann, T.; *Environmental Pollution*, **2009**, 157, 2759.
- Mol, H.G.J.; Sunarto, S.; Steijger, O.M.; *Journal of Chromatography A*, **2000**, 879, 97.
- Moeder, M.; Martin, C.; Schlosser, D.; Harynuk, J.; Górecki, T.; *Journal of Chromatography A*, **2006**, 1107, 233.
- Nieto, A.; Borrull, F.; Marcé, R.M.; Pocurrull, E.; *Journal of Chromatography A*, **2009**, 1216, 5619.
- Paxéus, N.; *Water Research*, **1995**, 30, 1115.
- Petrovic, M.; Barceló, D.; *Analytical Chemistry*, **2000**, 72, 4560.
- Petrovic, M.; Barcelo, D.; Diaz, A.; Ventura, F.; *Journal of American Society Mass Spectrometry*, **2003**, 14, 516.
- Petrovic, M.; Diaz, A.; Ventura, F.; Barceló, D.; *Analytical Chemistry*, **2001**, 73, 5886.

- Pan, Y-P.; Tsai, S-W.; *Analytica Chimica Acta*, **2008**, 624, 247.
- Regan, F.; Moran, A.; Fogarty, B.; Dempsey, E.; *Journal of Chromatography A*, **2003**, 1014, 141.
- Regueiro, J.; Becerril, E.; García-Jares, C.; Llompart, M.; *Journal of Chromatography A*, **2009a**, 1216, 4693.
- Regueiro, J.; Llompart, M.; Psillakis, E.; García-Monteagudo, J.C.; García-Jares, C.; *Talanta*, **2009b**, 79, 1387.
- Reid, A.M.; Brougham, C.A.; Fogarty, A.M.; Roche, J.J.; *Analytica Chimica Acta*, **2009**, 634, 197.
- Romero, J., Ventura, F.; Gomez M.; *Journal of Chromatographic Science*, **2002**, 40, 191.
- Rudel, R.A.; Melly, S.T.; Geno, P.W.; Sun, G.; Brody, J.G.; *Environmental Science and Technology*, **1998**, 32, 861.
- Rudel, R.A.; Camann, D.E.; Spengler, J.D.; Korn, L.R.; Brody, J.G.; *Environmental Science & Technology*, **2003**, 37, 4543.
- Saad, B.; Bari, M.F.; Saleh, M.I.; Ahmad, K.; Talib, M.K.M.; *Journal of Chromatography A*, **2005**, 1073, 393.
- Samsonova, J.V.; Rubtsova, M.Y.; Fránek, M.; *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2003**, 375, 1017.
- Scarlet, M.; Fisher, J.A.; Zhang, H.; Ronan, M.; *Water Research*, **1994**, 28, 2109.
- Scullion, S.D.; Clench, M.R.; Cooke, M.; Ashcroft, A.E.; *Journal of Chromatography A*, **1996**, 733, 207.
- Shang, D.Y.; Ikonomou, M.G.; Mcdonald, R.W.; *Journal of Chromatography A*, **1999a**, 849, 467.
- Shang, D.Y.; Macdonald, R.W.; Ikonomou, M.G.; *Environmental Science and Technology*, **1999b**, 33, 1366.
- Shao, B.; Hu, J-Y.; Yang, M.; *Journal of Chromatography A*, **2002**, 950, 167.
- Stasinakis, A.; Gatidou, G.; Mamais, D.; Thomaidis, N.S.; Lekkas, T.D.; *Water Research*, **2008**, 42, 1796.
- Valsecchi, S.; Polesello, S.; Cavalli, S.; *Journal of Chromatography A*, **2001**, 925, 297.

- Veith, G.P.; Kiwus, L.M.; *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **1977**, *17*, 631.
- Ventura, F.; Caixach, J.; Figueras, A.; Espalder, I.; Friase, D.; Rivera, J.; *Water Research*, **1989**, *23*, 1191.
- Vikelsoe, J.; Thomsen, M.; Carlsen, L.; *The Science of The Total Environment*, **2002**, *296*, 105.
- Wang, S-P.; Chang, C-L.; *Analytica Chimica Acta*, **1998**, *377*, 85.
- Wahlberg, C.; Renberg, L.; Wideqvist, U.; *Chemosphere*, **1990**, *20*, 179.
- Willetts, M.; Brown, V.A.; Clench, M.R.; *Journal of Chromatography A*, **2000**, *903*, 33.
- Working Document on Sludge,, Third Draft, European Commission, **2000**.
- Zhang, Q.; Lian, M.; Liu, L.; Cui, H.; *Analytica Chimica Acta*, **2005**, *537*, 31.
- Zhang, H.; Zuehlke, S.; Guenther, K.; Spiteller, M.; *Chemosphere*, **2007**, *66*, 594.



### **III. EXPERIMENTAL**



## CAPÍTULO I

**Determinación de nonilfenoles y nonilfenoles etoxilados en muestras sólidas de interés medioambiental mediante extracción asistida por ultrasonidos y HPLC-FL.**

Trabajo presentado en el congreso "Sample Handling for Environmental and Biological Analysis 2006" (Zaragoza 18-20 septiembre 2006). *Póster.*



## **1. CAPÍTULO I. Determinación de nonilfenoles y nonilfenoles etoxilados en muestras sólidas de interés medioambiental mediante extracción asistida por ultrasonidos y HPLC-FL.**

El objetivo de este trabajo fue el desarrollo de un método analítico sencillo, rápido y de fácil aplicación en los laboratorios de análisis de rutina para la determinación y cuantificación de manera conjunta de los nonilfenoles de cadena larga ( $\text{NPEO}_x$   $3 \leq x \leq 15$ ), los nonilfenoles de cadena corta ( $\text{NPEO}_1$  y  $\text{NPEO}_2$ ) y el nonilfenol de cadena lineal (4-n-NP) en muestras sólidas de interés medioambiental.

Para la separación de estos compuestos se empleó la cromatografía de líquidos y como técnica de detección se seleccionó la fluorescencia, ya que presenta una buena sensibilidad para estos compuestos y una mayor selectividad que los detectores de ultravioleta. Al tratarse de compuestos de muy distinta polaridad, su análisis cromatográfico presentó algunas dificultades seleccionándose finalmente una columna de polaridad intermedia para su separación, columna  $C_8$ , y un modo de elución isocrático AcN/ $H_2O$  (60/40).

Para la extracción de estos compuestos en las muestras sólidas, se buscó la miniaturización del método, a fin de minimizar las cantidades de disolventes a emplear. Se seleccionó la extracción asistida por ultrasonidos en pequeñas columnas por cumplir con este requisito y además ser una técnica suficientemente energética para extraer los compuestos de las muestras seleccionadas. Entre los parámetros optimizados cabe destacar los disolventes empleados, la temperatura, el número de ciclos de extracción y la cantidad de muestra. Así, se optó por partir de 2 g de muestra, realizar dos ciclos de extracción de 15 min cada uno a una temperatura de  $45^\circ\text{C}$  empleando una mezcla de 5 ml MeOH/ $H_2O$  (70/30) como disolución extractante. En estas condiciones fue posible obtener recuperaciones cuantitativas tanto de los compuestos menos polares ( $\text{NPEO}_1$ ,  $\text{NPEO}_2$  y 4-n-NP) como de los más polares ( $\text{NPEO}_x$   $3 \leq x \leq 15$ ).

Con el fin de eliminar otros compuestos coextraídos mediante esta técnica y potencialmente interferentes, se llevó a cabo un proceso de extracción en fase sólida como etapa de limpieza. Para ello, se utilizaron 500 mg de  $C_{18}$  como adsorbente y se optimizaron las diferentes etapas del proceso. Inicialmente se realizó el

acondicionamiento de los cartuchos con 2 x 6 ml de metanol y 1 x 6 ml de una mezcla agua/metanol (30/70), para posteriormente adicionar los 10 ml del extracto procedente de la etapa de extracción. Se realizó un lavado con 3x1 ml de mezcla H<sub>2</sub>O/MeOH (30/70) y finalmente con 3 x 1 ml de metanol la elución, para conseguir recuperar completamente los NPEO<sub>x</sub>, NPEO<sub>1</sub> y NPEO<sub>2</sub>. Sin embargo, para la elución completa del 4-n-NP fue necesario el empleo de 1 ml adicional de acetonitrilo.

En la figura 27 se representa un esquema del método completo desarrollado en este trabajo.

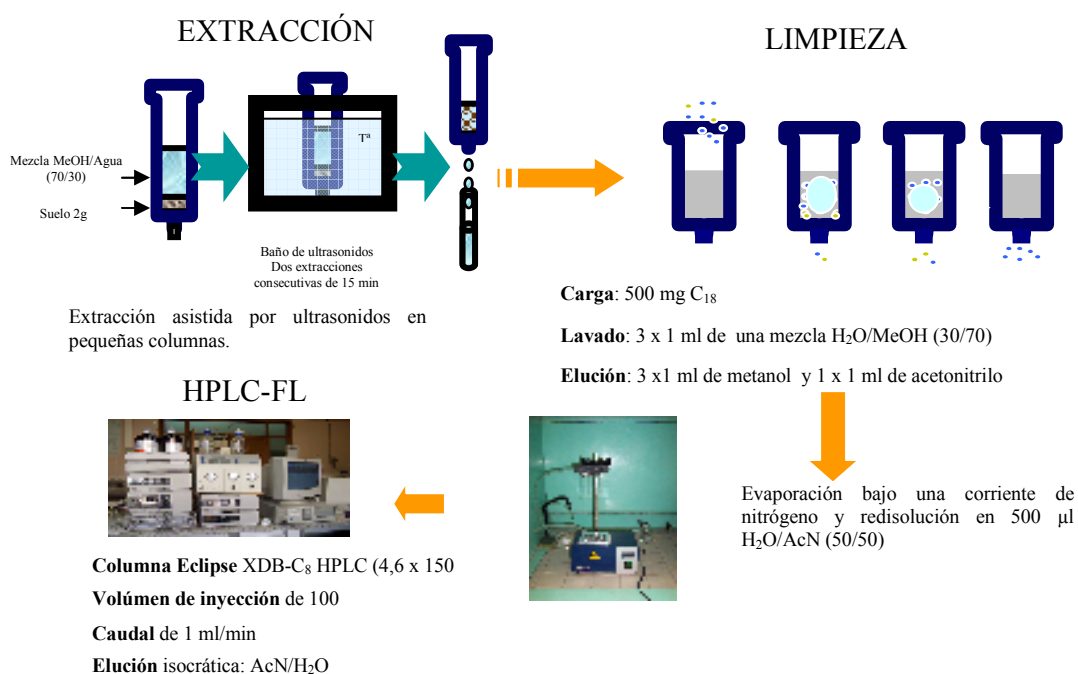


Figura 27. Esquema del proceso seguido para la determinación de 4-n-NP, NPEO<sub>1</sub>, NPEO<sub>2</sub> y NPEO<sub>x</sub>  $3 \leq x \leq 15$ .

Los límites de detección y cuantificación obtenidos se situaron entre 0.05-0.52 y 0.17-1.72 µg g<sup>-1</sup>, respectivamente, para los suelos y entre 0.11-0.50 y 0.38-1.67 µg g<sup>-1</sup> para los sedimentos, siendo inferiores a las concentraciones encontradas en muestras de suelos y sedimentos por otros autores.

Se analizaron varias muestras de suelos y sedimentos, pero en ninguna de ellas se encontraron residuos de los compuestos analizados por encima de los límites de detección del método.

En la tabla 19 se recogen algunas características analíticas obtenidas para los dos tipos de muestras.

Tabla 19. Recuperaciones (%R), desviación estándar relativa (RSD), límites de detección (LD) y cuantificación (LC) de los nonilfenoles y sus derivados etoxilados en suelos y sedimentos.

Compuesto	Suelos				Sedimentos			
	R% <sup>a</sup>	RSD	LD μg g <sup>-1</sup>	LC μg g <sup>-1</sup>	R% <sup>b</sup>	RSD	LD μg g <sup>-1</sup>	LC μg g <sup>-1</sup>
4-n-NP	84.2	14.1	0.06	0.20	88	5.1	0.11	0.38
NPEO <sub>1</sub>	90.6	10.1	0.06	0.19	94.7	2.5	0.22	0.74
NPEO <sub>2</sub>	97.3	5.2	0.05	0.17	82	1.3	0.31	1.04
NPEO <sub>x</sub> 3 ≤ x ≤ 15	90.8	11.1	0.52	1.72	88.5	5.6	0.50	1.67

<sup>a</sup> niveles de enriquecimiento: 0.5 μg g<sup>-1</sup> (4-n-NP); 1 μg g<sup>-1</sup> (NPEO<sub>1-2</sub>); 5 μg g<sup>-1</sup> (NPEO<sub>9</sub>)

<sup>b</sup> niveles de enriquecimiento: 2 μg g<sup>-1</sup> (4-n-NP); 4 μg g<sup>-1</sup> (NPEO<sub>1-2</sub>); 20 μg g<sup>-1</sup> (NPEO<sub>9</sub>)

Se analizaron también con este método otras muestras sólidas de interés medioambiental como lodos y compost, pero las recuperaciones obtenidas durante la extracción fueron menores en todos los casos al 40 % para el 4-n-NP y los derivados etoxilados de cadena corta. Este hecho se atribuyó al elevado contenido de materia orgánica de este tipo de muestras, lo que dificultaría la extracción y requeriría por tanto condiciones de extracción más energéticas y selectivas. No obstante, los valores obtenidos de RSD sí fueron aceptables (RSD < 15), por lo que el método se propuso como método de *screening* para detectar la presencia de los compuestos estudiados en



CONGRESO:

“Sample Handling for Environmental and Biological Analysis 2006”

(Zaragoza 18-20 septiembre 2006). *Póster.*

**DETERMINATION OF NONYLPHENOL AND NONYLPHENOL ETHOXYLATES IN ENVIRONMENTAL SOLID SAMPLES BY ULTRASONIC-ASSISTED EXTRACTION AND HPLC-FL**

L. Núñez, E. Turiel and J.L. Tadeo.

*Departamento de Medio Ambiente, INIA, Ctra. de La Coruña Km 7, 28040 Madrid, Spain*

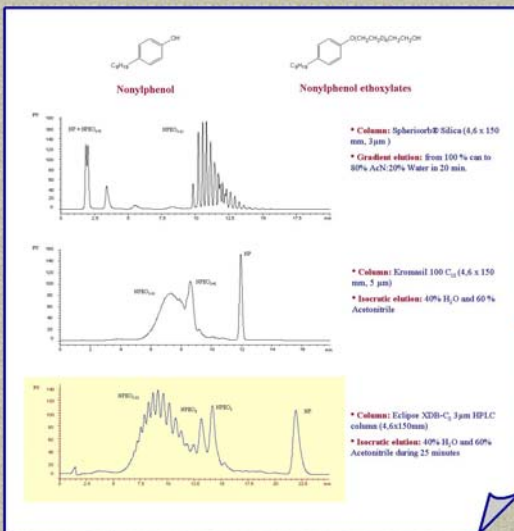
**INTRODUCTION**

Nonylphenol (NP) and nonylphenol ethoxylates (NPEOs) have been included among the group of organic compounds that have been so-called “emerging contaminants”. NPEOs are surfactants used worldwide, and are transformed in the environment by microorganisms to form nonylphenol and short-chain nonylphenol ethoxylates. NP is used in many industrial activities (i.e. epoxy resin hardeners, in leather industry) and it is also employed as raw material in production of ethoxylated nonylphenols. Other sources of contamination by these compounds are the refinement of petroleum and coal tar. During biological wastewater treatment NPEOs are partially converted to more persistent and toxic metabolites (NPEO<sub>1</sub>, NPEO<sub>2</sub>, NP). The toxic effect of these compounds is their ability to mimic natural estrogens and disrupt the endocrine systems of living organisms. It may hinder reproduction, growing and survival of certain animals such as salmon and oysters.

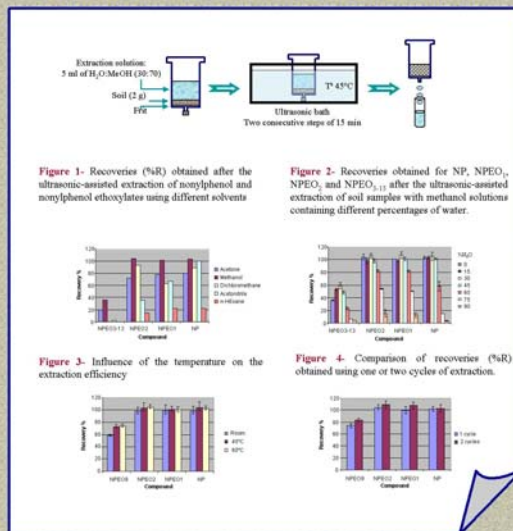
The main objective of the present work was the development of a simple and rapid analytical method suitable for the identification and quantification of NP, NPEO<sub>1</sub>, NPEO<sub>2</sub> and NPEO<sub>3</sub> with long chain in solid environmental samples in a single analysis. Soil samples have been selected for method optimisation and validation and the developed procedure was further evaluated for sediments, compost and sewage sludge samples.



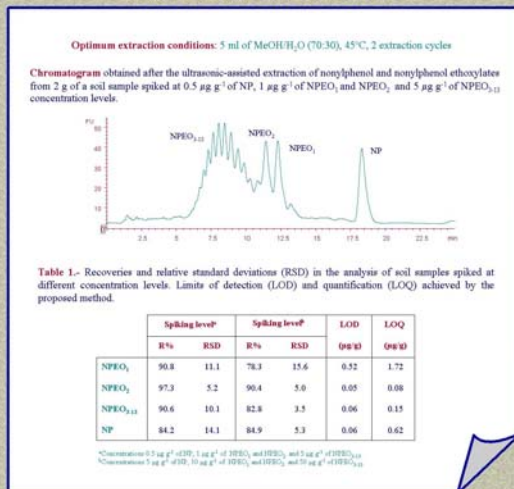
**CHROMATOGRAPHIC SEPARATION**



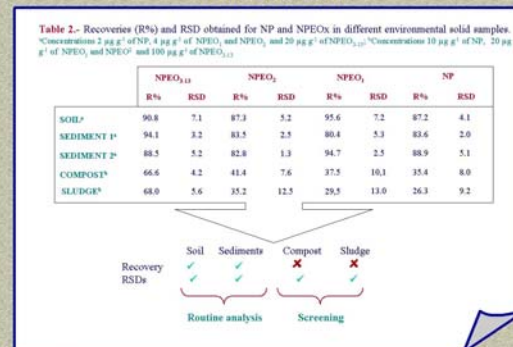
**OPTIMIZATION OF THE EXTRACTION PROCEDURE**



**ANALYTICAL PERFORMANCE**



**APPLICABILITY**



**CONCLUSIONS**

A simple, rapid and sensitive method has been developed for the simultaneous determination of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in solid environmental samples by HPLC-FL.

The suitability of the procedure for routine analysis of NP and NPEOs in soils and sediments at realistic concentration levels have been clearly demonstrated. Although further improvements should be done to increase recoveries, the developed procedure can be useful for screening of the selected compounds in compost and sludge samples.



## CAPÍTULO II

### **Polímero de impresión molecular para la extracción selectiva del nonilfenol y sus derivados etoxilados en muestras sólidas medioambientales.**

Trabajo presentado en los congresos:

*"Ninth International Symposium on Advances in Extraction Technologies (ExTech)"* (Alesund (Noruega) 3-6 de junio 2007). *Póster.*

*"IX Internacional Symposium on Analytical Methodology in the Environmental Field (ISAMEF)"* (Mallorca (España) 2-5 Octubre 2007). *Póster.*



## 2. CAPÍTULO II. Polímero de impresión molecular para la extracción selectiva del nonilfenol y sus derivados etoxilados en muestras sólidas medioambientales.

Como continuación al trabajo anterior en el que se vio que el método desarrollado no era del todo eficaz para los lodos, se desarrolló un nuevo método para permitir la determinación de los nonilfenoles en estas muestras

En este segundo trabajo se optó por un método de extracción más energético que la extracción por ultrasonidos como es la extracción asistida por microondas. Para lo cual se adaptó un proceso descrito anteriormente por Foukoulakis y col. (2005)<sup>1</sup>. En él, 100 mg de lodo ó 2 g de sedimentos se introducen en recipientes de teflón con 20 ml de n-Hexano y 1 ml de agua. La extracción de las muestras se lleva a cabo a 120 °C y 1200 W durante 15 min. Después de un proceso de centrifugación, los extractos obtenidos se evaporan hasta 5 ml para posteriormente adicionar 2 g de sulfato sódico y así eliminar el agua presente y poder evaporar a sequedad. Finalmente, los extractos se redissuelven en 7 ml de tolueno en el caso de los lodos y 1 ml de tolueno en el caso de los sedimentos.

Se sintetizaron cinco polímeros siguiendo el método de polimerización por precipitación, empleando en todos ellos el 4-n-NP como compuesto plantilla. Como monómeros se estudiaron tanto el ácido metacrílico (MAA) como la vinilpiridina (4-VP) y se ensayaron distintos volúmenes y mezclas de disolventes como porogen. El proceso de síntesis fue el mismo para todos los polímeros: a un tubo de ensayo de 15 ml se añaden 0.14 mmol de compuesto plantilla (4-n-NP), 0,54 mmol de monómero (MAA y 4-VP) y diferentes volúmenes de porogen (tolueno, y mezclas de tolueno y acetonitrilo). La mezcla se deja en contacto durante 5 min para posteriormente añadir 2.7 mmol de divinilbenceno (entrecruzante) y 0.2 mmol de 2,2'-azobisisobutilonitrilo (iniciador). El tubo se cierra y se introduce en un horno rotatorio (24 rpm) a una temperatura de 60°C durante 24 h. Las partículas de polímeros así obtenidas se filtran con un filtro de nylon y se dejan secar durante 24 h. Finalmente, el compuesto plantilla se elimina mediante la extracción Soxhlet con una mezcla de acetonitrilo/ácido acético (1/1) durante 10 h. Los polímeros no impresos se prepararon de forma similar pero sin añadir el compuesto plantilla.

---

<sup>1</sup> Fountoulakis, M.; Drillia, P.; Pakou, C.; Kampioti, A.; Stamatelatu, K.; Lyberatos, G.; *Journal of Chromatography A*, **2005**, 1089, 45.

En los polímeros en los que se había utilizado 4-VP como monómero las interacciones no específicas fueron siempre comparables a las interacciones específicas, a pesar de los distintos lavados ensayados, y las recuperaciones obtenidas tanto en el MIP como en el NIP fueron similares por lo que no fue posible demostrar la presencia de interacciones específicas.

Por otro lado, de los polímeros preparados con MAA como monómero, los sintetizados con mezclas acetonitrilo/tolueno (75/25) como porogen no dieron buenos resultados, ya que tanto en el MIP como en el NIP las recuperaciones obtenidas fueron muy bajas. En cambio en los preparados con tolueno y una concentración de MAA de 6.2% m/v, después de un proceso de optimización, las recuperaciones fueron cuantitativas en el MIP e inferiores al 20 % en el NIP, siendo por tanto este último el seleccionado para el desarrollo del proceso MISPE.

Se optimizaron las distintas etapas implicadas en los procesos de extracción en fase sólida, como son la carga, lavado y elución, realizando previamente una etapa de acondicionamiento con 2 x 6 ml de metanol, 2 x 6 ml de acetonitrilo, 2 x 6 ml de tolueno y 2 x 1 ml de tolueno. Las condiciones óptimas para la extracción MISPE fueron las siguientes: carga de la muestra en 1ml de tolueno, lavado con 1 ml de mezcla tolueno/acetonitrilo (90/10) y elución con 3 x 1 ml de metanol con 1 % de ácido acético. Bajo estas condiciones, el polímero utilizado permitió la extracción cuantitativa del 4-n-nonilfenol (4-n-NP), los nonilfenoles etoxilados de cadena corta (NPEO<sub>1</sub> y NPEO<sub>2</sub>) y los isómeros del nonilfenol (NP), los cuatro compuestos que presentan una mayor toxicidad de la familia. Los nonilfenoles etoxilados de cadena larga no pudieron ser determinados en este trabajo.

El empleo de la extracción asistida por microondas como técnica de extracción junto con una etapa de limpieza mediante MISPE permitieron la determinación de NP, 4-n-NP y NPEO<sub>1</sub> y NPEO<sub>2</sub> mediante HPLC-FL utilizando una columna Atlantis C<sub>18</sub> de 3 µm y un modo de elución isocrático acetonitrilo/agua (60/40).

En la figura 28 se recoge un esquema de método completo desarrollado en este trabajo.

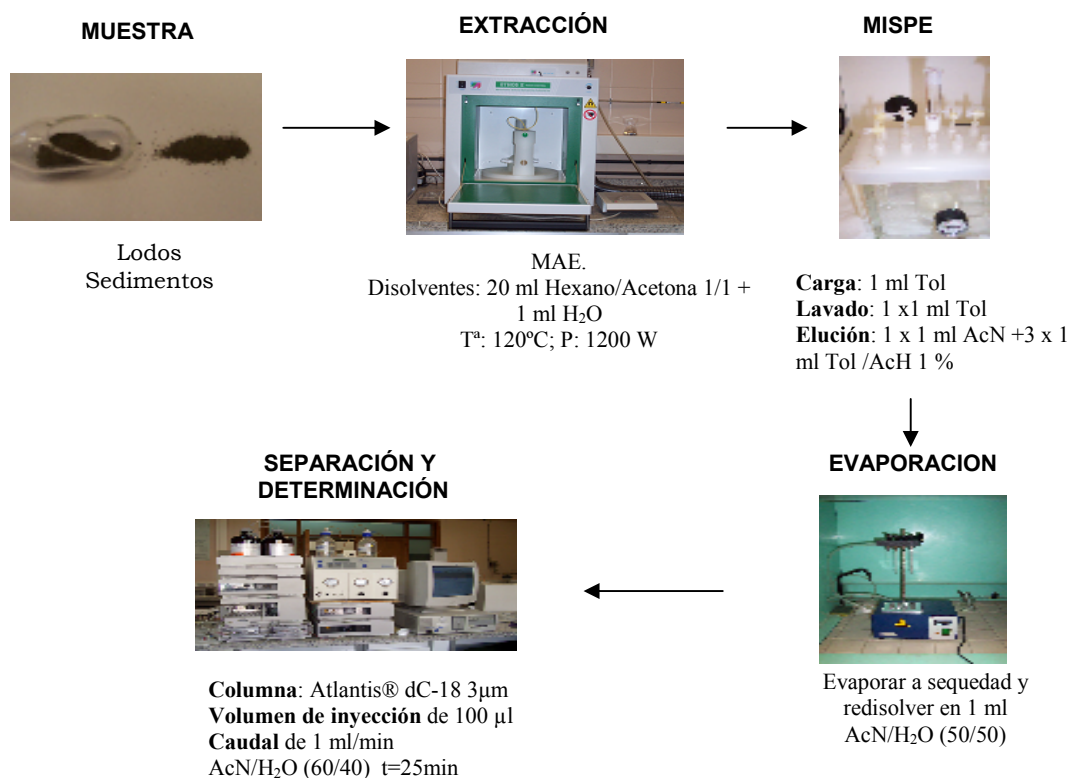


Figura 28. Esquema resumen del método utilizado para la determinación de NP, 4-n-NP y NPEO<sub>1</sub> y NPEO<sub>2</sub>.

Los límites de detección y cuantificación obtenidos mediante este segundo método (MAE-MISPE-HPLC-FL) se situaron entre 0.48 – 1.43 mg kg<sup>-1</sup> y 1.60 – 4.75 mg kg<sup>-1</sup> respectivamente, para los lodos y entre 0.02 - 0.06 mg kg<sup>-1</sup> y 0.08 - 0.20 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente, para los sedimentos, un orden de magnitud inferior al obtenido sin utilizar el proceso MISPE.

Se analizaron lodos procedentes de distintas plantas de tratamiento de la Comunidad de Madrid y en todos ellos se encontraron altas concentraciones de los compuestos bajo estudio, muy por encima de los límites de cuantificación obtenidos. La presencia de estos compuestos fue confirmada posteriormente con LC-MS/MS. Por otro lado, también se analizaron sedimentos y, al igual que en el trabajo anterior, no se

encontraron concentraciones de estos compuestos, aunque los límites de cuantificación obtenidos con este método se redujeron de forma considerable.

En la tabla 20 se resumen algunos parámetros de interés analítico de este método tanto para lodos como para sedimentos.

Tabla 20. Recuperaciones (%R), desviación estándar relativa (RSD), límites de detección (LD) y cuantificación (LC) de los nonilfenoles y sus derivados etoxilados en lodos y sedimentos.

Compuesto	Lodos				Sedimentos			
	R% <sup>a</sup>	RSD	LD mg kg <sup>-1</sup>	LC mg kg <sup>-1</sup>	R% <sup>b</sup>	RSD	LD mg kg <sup>-1</sup>	LC mg kg <sup>-1</sup>
4-n-NP	88	7	0.55	1.84	81	2	0.03	0.09
NP	104	8	1.13	3.75	110	14	0.02	0.08
NPEO <sub>1</sub>	73	6	1.43	4.75	85	13	0.06	0.20
NPEO <sub>2</sub>	60	7	0.48	1.60	65	5	0.06	0.19

<sup>a</sup> nivel de enriquecimiento: 35 µg g<sup>-1</sup> (4-n-NP, NP, NPEO<sub>1</sub>, NPEO<sub>2</sub>).

<sup>b</sup> nivel de enriquecimiento: 0.25 µg g<sup>-1</sup> (4-n-NP, NP, NPEO<sub>1</sub>, NPEO<sub>2</sub>).

CONGRESO:

“Ninth International Symposium on Advances in Extraction Technologies (ExTech)”  
 (Alesund (Noruega) 3-6 de junio 2007). *Póster.*

**MOLECULARLY IMPRINTED POLYMER FOR THE ENDOCRINE DISRUPTER: NONYLPHENOL AND SHORT CHAIN ETHOXILATED DERIVATES IN ENVIRONMENTAL SAMPLES.**

L. Núñez, E. Turiel, A. Martín-Esteban and J.L. Tadeo  
 Departamento de Medio Ambiente, INIA, Ctra. de La Coruña Km 7, 28040 Madrid, Spain

### INTRODUCTION

Nonylphenol (NP) and nonylphenol ethoxylates (NPEOs) have been included among the group of organic compounds that have been classified “emerging contaminants”. NPEOs are surfactants used worldwide, and are transformed in the environment by microorganisms to form nonylphenol and short-chain nonylphenol ethoxylates. NP is used in many industrial activities (i.e. epoxy resin hardeners, in leather industry) and it is also employed as raw material in production of ethoxylated nonylphenols. Other sources of contamination by these compounds are the refinement of petroleum and seal tar. During biological wastewater treatment NPEOs are partially converted to more persisted and toxic metabolites (NPEO<sub>1</sub>, NPEO<sub>2</sub>, NP). The toxic effect of these compounds is their ability to mimic natural estrogens and disrupt the endocrine systems of living organisms. It may hinder reproduction, growing and survival of certain animals such as salmon and oysters. The highest concentrations have been found in sludge, and thus selective methods for screening of these compounds in these complex matrix are necessary. In this work a MIP-based method has been developed and successfully used for this purpose.

### CHEMICAL STRUCTURES OF SELECTED ANALYTES

### Objetives

- Preparation of a molecularly imprinted polymer selective for nonylphenol and short chain ethoxylated derivatives using linear nonylphenol as template.
- Evaluation of the MIP for clean-up in the analysis of selected compounds in sludge samples.
- Determination of the contents of nonylphenol (isomers), linear nonylphenol and nonylphenol mono and di-ethoxylates in several sludge samples.

### POLYMER PREPARATION

Template	NP	1 mol
Monomer	MAA	4 mol
Crosslinker	DVB	20mol
Initiator	AIBN	
Theragel	Toluene	6 ml

**Figure 1.** Packing of MIP in cartridges.

### ANALYTICAL APPLICATION

**SAMPLE**

Sludge 150 mg

**EXTRACTION**

MAE.  
Solvents: Hexane/acetone 1:1 Vol; 20 ml  
+ 1 ml H<sub>2</sub>O  
T: 120°C; P: 1200 W

**MISPE**

Conditions showed in table 2

**SEPARATION AND DETERMINATION**

Column: Atlantis® dC-18 3µm  
AcN/H<sub>2</sub>O 65:35 t=25min

**EVAPORATION**

V<sub>0</sub> 0,1ml and dissolve in 1 ml  
AcN:H<sub>2</sub>O 50:50

### MISPE

**Figure 1.** Differences between MIP and NIP for NP (isomer), NP (linear), NPEO<sub>1,2</sub> and NPEO<sub>0</sub>.

**Figure 2.** Optimisation of washing solution.

**Figure 3.** Capacity study of NP-MIP for NPEO<sub>1,2</sub>, NPEO<sub>2</sub>, NP (isomer) and NP (linear).

**Table 2.** Optimum MISPE conditions for NP (isomers), NP (linear) and NPEO<sub>1,2</sub> in MIP.

STAGES	SOLVENTS
Load	Toluene
Wash	1X1 ml Toluene/Acetone/nitride 90/10
Elution	1X1 ml AcN+3X1 ml MeOH/AcH 1%

### Preliminary Results

**Figure 4.** Chromatogram obtained in the analysis of sludge samples.


### Conclusions

- Polymer particulates imprinted with linear NP have been prepared in a physical form suitable for MISPE.
- The obtained MIP showed high selectivity and was able to recognize not only linear NP but also NP (isomers), NPEO<sub>1</sub>, NPEO<sub>2</sub>.
- MIP cartridges showed an excellent performance allowing identification of NP (linear), NP (isomers), NPEO<sub>1</sub> and NPEO<sub>2</sub> in contaminated sludge samples.



CONGRESO:

“IX Internacional Symposium on Analytical Methodology in the Environmental Field (ISAMEF) (Mallorca (España) 2-5 Octubre 2007). Póster.



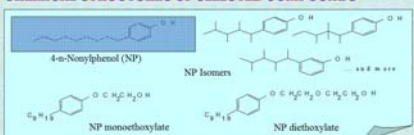
## MOLECULARLY IMPRINTED POLYMER FOR THE ANALYSIS OF THE ENDOCRINE DISRUPTERS NONYLPHENOL AND SHORT CHAIN ETHOXILATED DERIVATES IN ENVIRONMENTAL SAMPLES.

**L. Núñez, E. Turiel, A. Martín-Esteban and J.L. Tadeo.**  
Departamento de Medio Ambiente, INIA, Ctra. de La Coruña Km 7, 28040 Madrid, Spain

### OBJETIVES

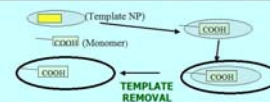
- Preparation of a molecularly imprinted polymer selective for nonylphenol and short chain ethoxylated derivatives using linear nonylphenol as template.
- Evaluation of the MIP as clean-up selective sorbent in the analysis of the selected compounds in sludge and sediments samples.
- Determination of the contents of nonylphenol isomers (NP), linear nonylphenol (4-n-NP) and nonylphenol mono and diethoxylated derivatives (NPEO<sub>1</sub> and NPEO<sub>2</sub>) in several environmental samples.

### CHEMICAL STRUCTURES OF SELECTED COMPOUNDS



### POLYMER PREPARATION

Template	NP	0.13 mmol
Monomer	MAA	0.54 mmol
Cross-linker	DVB	2.71 mmol
Initiator	AIBN	0.20 mmol
Porogen	Toluene	6 ml

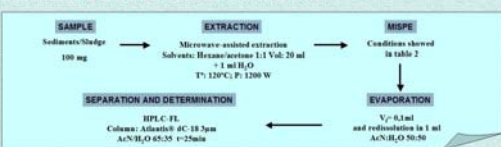


**POLYMERIZATION MIXTURE**  
CROSSLINKER + INITIATOR

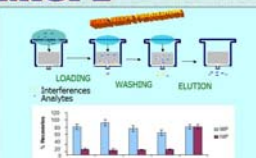
**TEMPLATE REMOVAL**

**T\* = 60°C**  
t = 24 hours

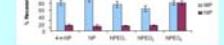
### ANALYTICAL APPLICATION



### MISPE



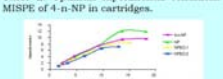
**Figure 1.** Recognition of structurally related compounds.



**Table 2.** Optimum experimental conditions for MISPE of 4-n-NP in cartridges.

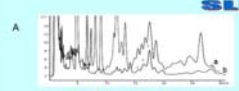
STAGES	SOLVENTS
LOADING	Toluene
WASHING	Diethyl Ether/Acetone 90/10 v/v
ELUTION	Acetone

**Figure 2.** Capacity study of NP-MIP for NPEO<sub>1</sub>, NPEO<sub>2</sub>, NP and 4-n-NP.



### FINAL RESULTS

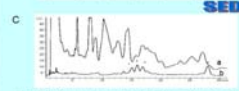
#### SLUDGE



4-n-NP		NP		NPEO <sub>1</sub>		NPEO <sub>2</sub>	
%R	RSD	%R	RSD	%R	RSD	%R	RSD
88	7	104	8	73	6	60	7

Table 3. Average recoveries (%R) and RSD (n=3) of NP (0.5 µg/ml), 4-n-NP (0.5 µg/ml) and NPEO<sub>1,2</sub> (1 µg/ml) in sludge samples.

#### SEDIMENTS



4-n-NP		NP		NPEO <sub>1</sub>		NPEO <sub>2</sub>	
%R	RSD	%R	RSD	%R	RSD	%R	RSD
81	2	100	14	85	13	65	5

Table 4. Average recoveries (%R) and RSD (n=3) of NP (0.5 µg/ml), 4-n-NP (0.5 µg/ml) and NPEO<sub>1,2</sub> (1 µg/ml) in sludge samples.

### MADRID SPTs CONCENTRATIONS

Table 5. Incurrence levels of NP, 4-n-NP, NPEO<sub>1</sub> and NPEO<sub>2</sub> in sludge samples from different STPs of Madrid.

Wastewater treatment plant	4-n-NP		NP		NPEO <sub>1</sub>		NPEO <sub>2</sub>	
	µg/g	RSD	µg/g	RSD	µg/g	RSD	µg/g	RSD
Plant 1	55.8	9.3	3.7	12.3	8.5	10.6	2.3	19.8
Plant 2	8.8	10.2	32.9	6.2	67.6	1.0	100.5	7.0
Plant 3	36.4	2.7	22.1	8.0	107.5	1.8	2.9	13.5
Plant 4	75.7	12.0	20.1	10.0	22.4	13.6	2.4	10.4

### CONCLUSIONS

- Polymer particulates imprinted with linear NP have been prepared in a physical form suitable for MISPE.
- The obtained MIP showed high selectivity and was able to recognize not only linear 4-n-NP but also NP, NPEO<sub>1</sub>, NPEO<sub>2</sub>.
- MIP cartridges showed an excellent performance allowing identification of 4-n-NP, NP, NPEO<sub>1</sub> and NPEO<sub>2</sub> in contaminated sludge and sediments samples.



## CAPÍTULO III

### **Determinación de nonilfenoles y sus derivados etoxilados de cadena larga mediante cromatografía electrocinética micelar (MEKC).**

Trabajo presentado en el congreso “*HPLC 2009*” (Dresden (Alemania) 28 junio-2 julio 2009). *Póster*.



### 3. CAPÍTULO III. Determinación de nonilfenoles y sus derivados etoxilados de cadena larga mediante cromatografía electrocinética micelar (MEKC).

El objetivo de este trabajo fue el empleo de la cromatografía electrocinética micelar (MEKC) para la separación de los derivados etoxilados de cadena larga del nonilfenol hasta línea base y su determinación junto con la mezcla de isómeros del nonilfenol. Esta separación no se había conseguido hasta el momento utilizando MEKC y se logró optimizando las variables más influyentes en electroforesis capilar: disolución reguladora a emplear, pH, utilización de surfactantes tales como el dodecil sulfato sódico (SDS) o el colato de sodio (SC), composición de la muestra y el tiempo de inyección.

Se estudiaron distintos electrolitos de fondo, tales como ácido 2-[N-ciclohexilamino]etanosulfónico (CHES), ácido 3-(ciclohexilamino)propanosulfónico (CAPS), fosfatos sodicos y borato y se ajustaron sus pH utilizando 0.1 M de hidróxido sódico. A estas disoluciones reguladoras se le añadieron distintas concentraciones de SDS, de SC, o mezcla de ambos. Después de varios estudios se comprobó que el empleo de CHES como disolución reguladora a un pH 9.1 para asegurar que todos los compuestos se encontraban en forma neutra ( $pK_a$ : 10.2), junto con el uso de 50 mM de SC como surfactante en la disolución reguladora permitía la separación deseada de los compuestos.

En un segundo estudio, una vez conseguida la separación deseada, se analizó el efecto que el volumen de muestra y el tipo de matriz introducida en el capilar (*stacking*) podían tener en la eficiencia de la separación, la resolución y la sensibilidad de la técnica. Para investigar el efecto del tiempo de inyección, se inyectó hidrodinamicamente en un capilar un patrón disuelto en agua a diferentes intervalos de tiempo, entre 3 y 50 s a una presión de 50 mbar y utilizando como electrolito de fondo el optimizado anteriormente. Finalmente una inyección de 10 s fue seleccionada como óptima. Sin embargo, el empleo de sales disueltas en la muestra, como NaCl, permitieron aumentar el tiempo de inyección y la resolución. Se analizaron distintas concentraciones de NaCl, entre 0 y 70 mM y finalmente se comprobó que una concentración de NaCl 50 mM junto con un tiempo de inyección de 20 s daban lugar a

una mejor separación, una mejor resolución de los picos y un incremento de la sensibilidad.

Junto con la separación de los compuestos en estudio, se desarrolló un método completo para la determinación de los mismos en muestras de aguas residuales. Se optimizó un método de extracción líquido-líquido utilizando tolueno como disolvente extractante. Finalmente, la extracción se realizó sobre una alícuota de 80 ml de agua, empleando tres fracciones de 80 ml de tolueno. Las fracciones orgánicas obtenidas se unieron y evaporaron hasta sequedad con un rotavapor y nitrógeno para su posterior redisolución en 1 ml de disolución acuosa de 50 mM de NaCl y su análisis. Siguiendo este método se obtuvieron recuperaciones cuantitativas para todos los compuestos, alcanzándose un factor de preconcentración de 80. Así los límites de detección y cuantificación se situaron entre  $3.8 - 9.2 \text{ ng ml}^{-1}$  y  $12.7 - 30.8 \text{ ng ml}^{-1}$ , respectivamente y dependiendo del analito. En la figura 29 se representa un esquema del método completo desarrollado en este trabajo y en la tabla 21 sus características analíticas.

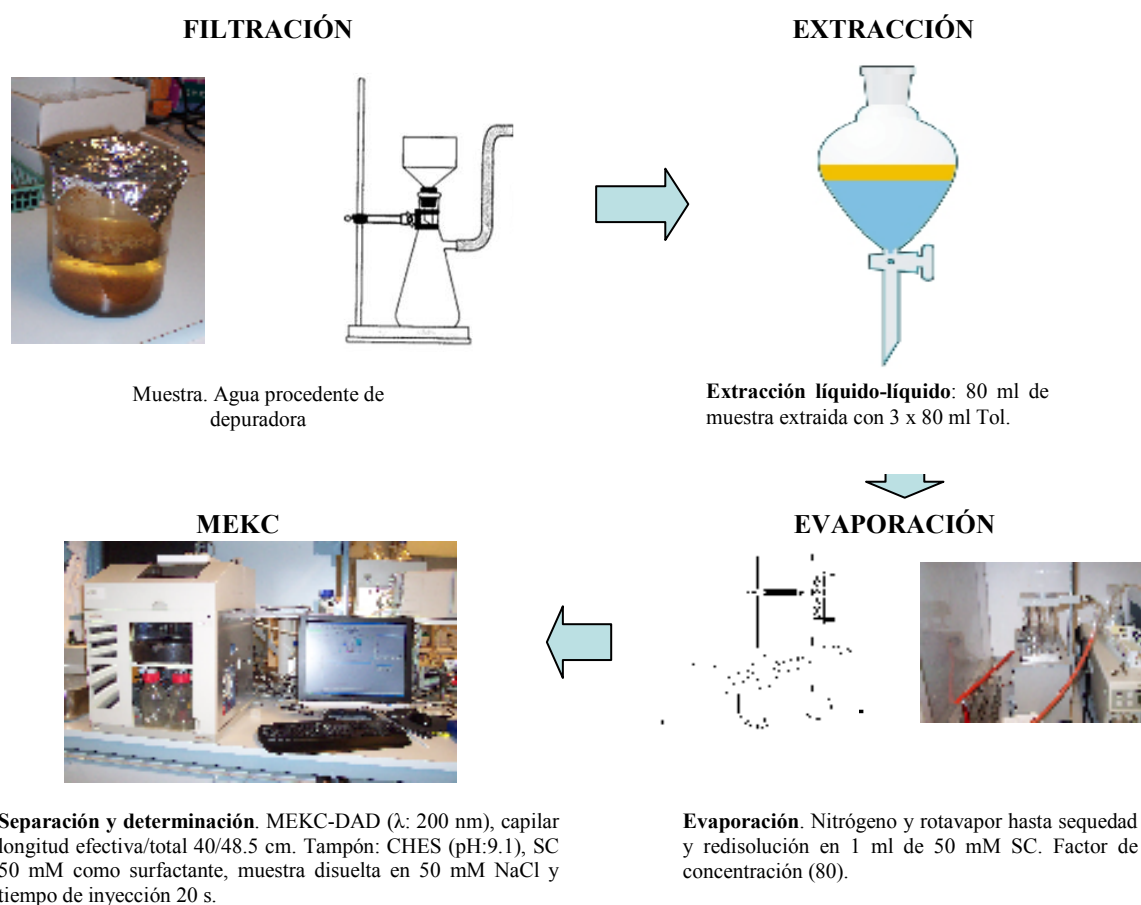


Figura 29. Esquema resumen método LLE-MEKC-UV.

Tabla 21. Recuperaciones (%R), desviación estándar relativa (RSD), límites de detección (LD) y cuantificación (LC) del nonilfenol y sus derivados etoxilados de cadena larga en aguas residuales utilizando el método LLE-MEKC-UV.

Compuestos	%R <sup>a</sup>	RSD	LOD ng ml <sup>-1</sup>	LOQ ng ml <sup>-1</sup>
NP	107	9	3.8	12.7
3	102	7	7.9	25.6
4	103	6	4.2	14.8
5	98	10	8.9	24.9
6	96	8	4.1	13.6
7	96	7	5.9	18.4
8	94	5	7.9	26.2
9	90	9	7.2	23.9
10	87	8	4.8	15.9
11	88	10	8.0	26.5
12	85	8	6.3	21.1
13	86	9	9.2	30.8
14	83	7	6.2	20.5
15	83	8	8.0	26.8

<sup>a</sup> Niveles de enriquecimiento: 31 ng ml<sup>-1</sup> (NP) y 625 ng ml<sup>-1</sup> (NPEO<sub>x</sub> (3 ≤ x ≤ 15)).


Finalmente, se analizaron varias muestras de aguas residuales procedentes de distintas etapas de una planta de tratamiento de aguas residuales situada en Helsinki (Finlandia). En una de las muestras analizadas, que correspondía a la primera etapa de tratamiento, se encontró NPEO<sub>9</sub> en concentraciones del orden de 30 ng l<sup>-1</sup>. Para confirmar este resultado se empleó un espectrómetro de masas acoplado a un cromatógrafo de líquidos. El análisis se realizó mediante inyección directa utilizando un modo de ionización positiva tanto de un patrón de NPEO<sub>9</sub> como de una muestra de agua residual. Como pico base se utilizó el de mayor intensidad m/z 640 y para la determinación y confirmación del NPEO<sub>9</sub> el espectro MS<sup>3</sup> (m/z 640 → 553 → 375, 287, 199). Tanto en el patrón como en la muestra se encontraron los mismos picos, confirmándose así, la presencia de NPEO<sub>9</sub>, y la validez del método.



CONGRESO:

“HPLC 2009”

(Dresden (Alemania) 28 junio-2 julio 2009). Póster.



## Determination of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates by micellar electrokinetic capillary chromatography. Application to waste water samples.

S.K. Wiedmer<sup>1\*</sup>, L. Núñez<sup>1,2</sup>, J. Parshintsev<sup>1</sup>, K. Hartonen<sup>1</sup>, M.-L. Riekkola<sup>1</sup>, J.L. Tadeo<sup>2</sup>, E. Turie<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>Laboratory of Analytical Chemistry, Department of Chemistry, P.O.Box 55, 00014 University of Helsinki, Finland,  
<sup>2</sup>Departamento de Medio Ambiente, INIA, Ctra. de La Coruña Km. 7, 28040 Madrid, Spain

Correspondence: susanne.wiedmer@helsinki.fi, marja-liisa.riekkola@helsinki.fi

**Introduction and aim**

Nonylphenol ethoxylates are surfactants which are used worldwide and can be transformed in the environment by microorganisms to form nonylphenol (Fig 1). The aim of the work was to develop a fast micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC) method for the determination of nonylphenol ethoxylates in waste water.

**Results and discussion**

Analysis of these compounds was carried out with MEKC. Different parameters such as background electrolyte (BGE) solution, pH, type of surfactant, and sample stacking were optimized. The use of CHES (20 mM, pH 9.1) in combination with 50 mM sodium cholate as a surfactant as BGE solution, together with sample stacking using 50 mM NaCl in the sample and an injection time of 20 s, provided the best separation of the compounds studied (Figs. 2-4). The method was applied to the determination of target analytes in two types of sludge water coming from two steps of a wastewater treatment plant. Liquid-liquid extraction was carried out using toluene as solvent, resulting in recoveries around 100% for all studied analytes. The presence of nonylphenol polyethoxylates was observed in the first step of the sludge water treatment, based on migration time and UV spectra (Figs. 5-6). Identification was confirmed using tandem MS. LOQs of the studied compounds were in the range of 12.7 to 30.8 ng/mL, which is satisfactory for the analysis of real waste water samples (Table 1).

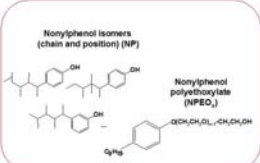


Figure 1. Structures of NP and NPEO<sub>x</sub>.

**Experimental**

**MEKC**  
 -HPLC/CE system equipped with a diode array detection system (Agilent, Waldbronn, Germany) and air cooling for the capillary cassette.  
 -CE parameters: voltage +20 kV (current <100 µA); UV detection at 200 nm; capillary cassette temperature 25.0 °C; hydrodynamic sample injection 50 mbar for 3-50 s. Uncoated fused-silica capillaries of 50 µm ID, 364 µm OD, and with a total length of 48.5 cm (40.0 cm to the detector) from Polymicro Technologies (Phoenix, Arizona, USA).

**Direct MS analysis**  
 -Bruker Esquire 3000 plus IT-MS (Bruker Daltonics, USA)  
 -direct inj. of standard solution and samples in methanol/water mixture (50:50, v/v) at 250 µh; ESI in negative mode; capillary voltage +4000 V, end plate offset -500 V, nebulizer pressure 0.69 bar (nitrogen), drying gas (nitrogen) 4 L/min, drying temperature 250 °C, scan mode (m/z 100-740), NP isomers at m/z 219 (deprotonated molecular ion) for MS<sup>1</sup> experiments (cut-off 59, amplitude 0.70, width 4.0).  
 -nonylphenol ethoxylate. MS<sup>1</sup> (m/z 640 → 553 → 375, 287, 199) spectra of standard solution and a sludge water sample; capillary voltage -4000 V, end plate offset -500 V, nebulizer pressure 0.69 bar (nitrogen), drying gas (nitrogen) 4 L/min, drying temperature 250 °C  
 -scan mode (m/z 70-740)

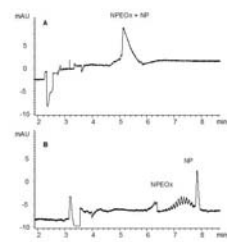


Figure 2. Influence of SDS and SC in 20 mM CHES at pH 9.1. A: 20 mM CHES at pH 9.1 + 50 mM SDS and B: 20 mM CHES at pH 9.1 + 50 mM SC. Concentrations: 5 µg/mL of NP and 50 µg/mL of NPEO<sub>x</sub> (3 ≤ x ≤ 15). Running conditions: voltage 20 kV, temp. 25°C, inj. 3 s at 50 mbar, UV-det. at 200 nm. Samples were dissolved in water.

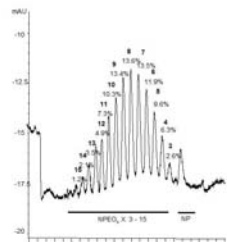


Figure 4. Electropherogram of the oligomers NPEO<sub>x</sub> (3 ≤ x ≤ 15). The BGE solution comprised 20 mM CHES at pH 9.1 and 50 mM SC. Running conditions: voltage 20 kV, temp. 25°C, inj. 20 s at 50 mbar, UV-det. at 200 nm. Analyte concentrations were 5 µg/mL of NP and 100 µg/mL of NPEO<sub>x</sub> (1.20 µg/mL of NPEO<sub>3</sub>, 2.14 µg/mL of NPEO<sub>4</sub>, 3.39 µg/mL of NPEO<sub>5</sub>, 4.97 µg/mL of NPEO<sub>6</sub>, 7.33 µg/mL of NPEO<sub>7</sub>, 10.28 µg/mL of NPEO<sub>8</sub>, 12.22 µg/mL of NPEO<sub>9</sub>, 13.6 µg/mL of NPEO<sub>10</sub>, 13.5 µg/mL of NPEO<sub>11</sub>, 11.9 µg/mL of NPEO<sub>12</sub>, 9.56 µg/mL of NPEO<sub>13</sub>, 6.28 µg/mL of NPEO<sub>14</sub>, 3.58 µg/mL of NPEO<sub>15</sub>). Samples were dissolved in 50 mM NaCl.

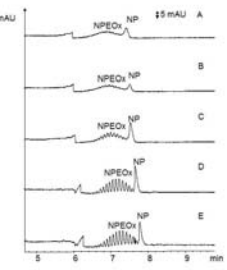


Figure 3. Influence of sample stacking on the separation. Electropherograms of the standard solution at a concentration of 5 µg/mL of NP and 50 µg/mL of NPEO<sub>x</sub> (3 ≤ x ≤ 15) and injection time of 20 s at 50 mbar with different concentrations of NaCl: A: 0 mM, B: 10 mM, C: 20 mM, D: 50 mM, and E: 70 mM. The BGE solution comprised 20 mM CHES at pH 9.1 and 50 mM SC.

**Sample preparation**

Waste water sludge samples collected (November 12, 2008) from a wastewater treatment plant in Helsinki.  
 -Sample 1: raw undigested sludge (after screens, grit removal, ferrous sulphate and lime treatment, and pre-aeration) with 4.9 % solid material.  
 -Sample 2: excess sludge after further sedimentation, aeration and treatment with ferrous sulphate.  
 -Filtrated sludge water samples were stored until needed at +5 °C.  
 -Liquid-liquid extraction: 3 X 80 mL toluene; evaporation; redissolution in 1 mL of 50 mM NaCl; filtration (0.45 µm) before analysis.  
 -> concentration factor of 80

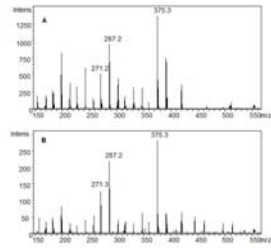


Figure 6. MS<sup>1</sup>-Spectra (m/z 640 → 553 → 375, 287, 199) A: Standard NPEO<sub>x</sub> mixture; B: Sludge water. See experimental section for details.

Table 3. Calibration coefficient, precision, detection and quantification limits of the method for the studied compounds. Numbered compounds correspond to NPEO<sub>x</sub>.

Comp. <sup>a</sup>	Corr. coeff. (R)	Precision RSD % <sup>b</sup>	Precision RSD % <sup>b</sup>	LOD <sup>c</sup> µg/mL	LOQ <sup>c</sup> ng/mL	LOQ <sup>c</sup> ng/mL
n=3	0.997	0.25	17.9	0.3	7.9	25.6
4	0.993	0.27	17.8	0.6	4.2	14.8
5	0.999	0.26	9.2	0.9	8.9	24.9
6	0.998	0.26	7.2	1.2	4.1	13.6
7	0.999	0.25	5.7	1.8	5.9	18.4
8	0.999	0.26	4.7	2.6	7.9	26.2
9	0.996	0.26	4.2	3.1	7.2	23.9
10	0.997	0.25	4.5	3.4	4.8	15.9
11	0.996	0.26	3.8	3.4	6.0	26.5
12	0.996	0.25	5.7	3.0	6.3	21.1
13	0.998	0.25	6.1	2.4	9.2	30.8
14	0.992	0.25	5.7	1.6	6.2	20.5
15	0.994	0.25	8.4	0.9	8.0	26.8
NP	0.993	0.22	11.8	0.1	3.8	12.7

<sup>a</sup> Concentrations: 5 µg/mL of NP and 1.20 µg/mL of NPEO<sub>3</sub>, 2.14 µg/mL of NPEO<sub>4</sub>, 3.39 µg/mL of NPEO<sub>5</sub>, 4.97 µg/mL of NPEO<sub>6</sub>, 7.33 µg/mL of NPEO<sub>7</sub>, 10.28 µg/mL of NPEO<sub>8</sub>, 12.22 µg/mL of NPEO<sub>9</sub>, 13.6 µg/mL of NPEO<sub>10</sub>, 13.5 µg/mL of NPEO<sub>11</sub>, 11.9 µg/mL of NPEO<sub>12</sub>, 9.56 µg/mL of NPEO<sub>13</sub>, 6.28 µg/mL of NPEO<sub>14</sub>, 3.58 µg/mL of NPEO<sub>15</sub>.  
<sup>b</sup> LOD for the MEKC-UV  
<sup>c</sup> LOD and LOQ for the LLE-MEKC-UV procedure. A concentration factor of 80 was used in the calculations (see experimental).

**Concluding remarks**

In this work we demonstrate the successful separation of NP and 13 oligomers of NPEO<sub>x</sub> from x = 3 to x = 15 by MEKC. The use of 20 mM CHES at pH 9.1 and 50 mM SC BGE solution and NaCl sample stacking provided the best separation. The suitability of the analytical procedure for routine analysis of NP and long chain NPEO<sub>x</sub> in sludge water at usual concentration levels was demonstrated. Liquid-liquid extraction with toluene proved to be suitable for the extraction of the studied compounds from waste water sludge samples. Sludge water samples from two different process steps of a waste water treatment plant in Helsinki (Finland) were analyzed. One of the studied ethoxylates derivatives was observed at a concentration of 30 ng/mL in the raw undigested sludge water taken from the beginning of the treatment process. The developed method proved to be suitable for the studied standard and real samples and the relatively short analysis time in combination with sufficient separation make the presented procedure highly attractive.

**Acknowledgments**  
 Authors want to thank INIA for a predoctoral fellowship (L. Núñez) and Spanish Ministry of Science and Innovation (RTA 2008-00040) for financial support. Financial support was provided also by the Research Council for Natural Sciences and Engineering, the Academy of Finland under grants 116288 (M.-L.R.) and 114292 (SKW), and by the University's Research Funds, University of Helsinki, grant no. 2105060 (SKW). MSC Tommi Fried from Helsinki Water is gratefully acknowledged for providing waste water sludge samples from waste water treatment plant in Viikinkaari, Helsinki, Finland. We are grateful to Dr. Juhani Kronholm for help with filtration of the sludge samples.



## CAPÍTULO IV

**Determinación de parabenos en muestras sólidas de interés  
medioambiental mediante extracción asistida por ultrasonidos y  
LC-MS/MS.**



#### **4. CAPÍTULO IV. Determinación de parabenos en muestras sólidas de interés medioambiental mediante extracción asistida por ultrasonidos y LC-MS/MS.**

El objetivo de este trabajo fue el desarrollo de un método analítico sencillo y rápido para la determinación y cuantificación de manera conjunta de varios parabenos, concretamente metil (MeP), etil (EtP), isopropil (iPrP), propil (PrP), butil (BuP) y bencilparabeno (BzP), en muestras sólidas de interés medioambiental, como suelos y sedimentos.

Para la extracción de estos compuestos se utilizó la extracción asistida por ultrasonidos en pequeñas columnas de manera similar a como anteriormente se había utilizado para la familia de los nonilfenoles. En este caso se situaron 10 g de muestra en las columnas y se realizó una extracción de dos ciclos de 15 min con 7 ml de acetonitrilo en un baño de ultrasonidos. Después de la extracción, se recogieron los extractos y se evaporaron hasta 1 ml para su posterior análisis. Las recuperaciones obtenidas fueron cuantitativas para todos los compuestos.

Dado que las concentraciones esperadas de estos compuestos en muestras medioambientales eran muy bajas, en este trabajo se recurrió a la cromatografía de líquidos acoplada a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (LC-MS/MS) para la separación y determinación de los compuestos. La separación mediante cromatografía de líquidos se llevó a cabo utilizando una columna C<sub>8</sub> y una fase móvil compuesta por una disolución 5 mM de formiato amónico en agua (A) y otra 5 mM de formiato amónico en metanol (B), con inyecciones de 10 µl de volumen y un flujo de 0.5 ml min<sup>-1</sup>. El gradiente de elución utilizado fue el siguiente: 40 – 85% B en 10 min manteniéndolo constante 2 min y posteriormente reducir a 80% B en otros 2 min y a 78% B en 1 min.

Para su análisis se utilizó un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo con electrospray como interfase en modo negativo y un flujo de gas de 9 l min<sup>-1</sup> a una temperatura de 350°C. Mediante inyecciones de flujo se optimizó la energía de colisión y fragmentor para cada compuesto. Como ión precursor se seleccionó el ión molecular desprotonado y entre los iones producto se seleccionó el más intenso como cuantificador y otro como cualificador. Los isómeros iPrP y PrP presentaban el mismo

precursor y los mismos dos iones producto, 137 y 92, pero el cualificador y el cuantificador fueron distintos. Para el iPrP el cuantificador fue el 137 y el cualificador el 92, y al contrario en el caso del PrP.

La figura 30 recoge un esquema del método desarrollado en este trabajo.



Figura 30. Esquema del proceso seguido para la determinación de MeP, EtP, iPrP, PrP, BuP, BzP.

Tabla 22. Recuperaciones (%R), desviación estándar relativa (RSD), límites de detección (LD) y cuantificación (LC) de los parabenos en suelos y sedimentos.

Compuesto	Suelos				Sedimentos			
	R% <sup>a</sup>	RSD	LD $\text{ng g}^{-1}$	LC $\text{ng g}^{-1}$	R% <sup>a</sup>	RSD	LD $\text{ng g}^{-1}$	LC $\text{ng g}^{-1}$
MeP	83.1	7.2	0.08	0.27	105.0	6.7	0.14	0.49
EtP	88.5	5.1	0.05	0.16	102.5	10.3	0.09	0.31
iPrP	88.2	4.1	0.05	0.16	83.2	4.3	0.04	0.11
PrP	84.9	4.3	0.12	0.39	110.2	9.8	0.08	0.28
BzP	90.5	2.5	0.06	0.21	84.5	5.9	0.08	0.29
BuP	93.1	5.4	0.08	0.28	96.5	3.7	0.06	0.21

<sup>a</sup> Niveles de enriquecimiento: 1  $\text{ng g}^{-1}$  (MeP, EtP, iPrP, PrP, BzP, BuP)

En la tabla 22 se resumen algunas de las características analíticas del método. Las recuperaciones fueron cuantitativas para todos los analitos bajo estudio y los límites de detección y cuantificación obtenidos, dependiendo del compuesto, se situaron entre 0.05-0.12 y 0.16-0.39 ng g<sup>-1</sup>, respectivamente, para los suelos y entre 0.04-0.14 y 0.11-0.49 ng g<sup>-1</sup> para los sedimentos.

Finalmente se analizaron múltiples muestras de suelos y sedimentos de distinta procedencia. En todas las muestras se encontraron residuos de distintos parabenos en concentraciones superiores a los límites de cuantificación del método. Las concentraciones más altas correspondieron al MeP y el PrP, los cuales, como se mencionó en la introducción son los dos parabenos más empleados.



## CAPÍTULO V

**Polímero de impresión molecular para la extracción selectiva de parabenos en muestras sólidas medioambientales y posterior determinación con HPLC-UV.**



## **5. CAPÍTULO V. Polímero de impresión molecular para la extracción selectiva de parabenos en muestras sólidas medioambientales y posterior determinación con HPLC-UV.**

Como continuación al trabajo anterior, se desarrolló un nuevo método basado en el empleo de la cromatografía líquida de alta resolución junto con un detector ultravioleta (HPLC-UV) como técnica de determinación final de los parabenos.

El método analítico completo para la determinación de los parabenos consistió en tres etapas; la primera fue el proceso de extracción mediante ultrasonidos, semejante al del artículo anterior, con la diferencia de utilizar 15 g de muestra en lugar de 10 g; una segunda etapa de limpieza mediante un proceso MISPE y posterior evaporación y redisolución del extracto en 0.5 ml AcN/H<sub>2</sub>O (50/50); y un tercera etapa de separación y determinación mediante HPLC-UV (figura 31).

La parte crítica de este trabajo fue la puesta a punto de la etapa de limpieza. Para ello se recurrió a los polímeros de impresión molecular, seleccionando el bencilparabeno como compuesto plantilla. Se prepararon distintos polímeros y al igual que para el nonilfenol se utilizó el método de polimerización por precipitación. Todos los polímeros se prepararon siguiendo la relación molar 1:4:20 entre plantilla:monómero:entrecruzante, por lo que el proceso a seguir fue el siguiente: a un tubo de ensayo de 15 ml se añadieron 0.14 mmol de compuesto plantilla (BzP), 0.54 mmol de monómero (MAA y 4-VP) y 10 ml de distintos porógenos (tolueno o mezcla acetonitrilo/tolueno) y se dejó en contacto durante 5 min para formar el complejo de prepolimerización. Seguidamente se añadieron 2.71 mmol de entrecruzante (DVB) y 0.2 mmol del iniciador (AIMN). El tubo posteriormente se introdujo en un horno rotatorio a 60 °C durante 24 h. Pasado este tiempo el polímero se secó y la plantilla se eliminó mediante Soxhlet con una mezcla de metanol/ácido acético (1/1) durante 12 h. El polímero no impreso (NIP) se preparó de manera similar pero sin añadir el analito plantilla. De todos los polímeros preparados, el que mejores resultados dio fue el sintetizado empleando ácido metacrílico (MAA) como monómero, divinil benceno (DVB) como entrecruzante y tolueno como porógeno (4% m/v), ya que en los preparados con 4-VP y porógeno Tol/AcN (25/75) ó MAA y porógeno Tol/AcN (25/75) no se observaron diferencias significativas entre el MIP y el NIP.

Una vez obtenido el polímero, la optimización del proceso MISPE se llevó a cabo utilizando 200 mg de material, tanto de MIP y NIP, que se situaron en dos cartuchos de extracción en fase sólida y se acondicionaron con 50 ml de metanol, 50 ml de acetonitrilo y 50 ml de tolueno. Finalmente, la carga se realizó con 1 ml de tolueno, la etapa de limpieza con 1 x 1 ml de tolueno y 1 x 1 ml de mezcla Tol/AcN (90/10), y la elución de los analitos con 1 x 1 ml acetonitrilo, 1 x 1 ml de metanol y 5 x 1 ml de metanol con 2.5 % de ácido acético. Los extractos resultantes se evaporaron hasta sequedad y se redisolviéron en 0.5 ml de agua/acetonitrilo (50/50) para su posterior análisis mediante HPLC-UV.

La separación y determinación mediante HPLC-UV se llevó a cabo con una columna C<sub>8</sub>, utilizando una fase móvil trifásica en modo gradiente, la cual fue optimizada con el fin de conseguir la correcta separación de MeP, EtP, iPrP, PrP, iBuP, BuP y BzP. El programa de elución fue el siguiente: (1) durante 10 min se mantuvo una fase móvil constante 60% A (agua), 25% B (AcN) y 15% (MeOH); (2) en los siguientes 10 min se incrementó la proporción de fase orgánica a 40% B y 30% C para (3) posteriormente volver a las condiciones iniciales en 3 min. Al analizar muestras reales fue necesario añadir una etapa más de limpieza de la columna con 80% B y 10% C. Con un volumen de inyección de 50 µl y un flujo de 1.5 ml min<sup>-1</sup> se consiguió la separación de los siete compuestos en menos de 20 min. En la figura 31 se muestra un esquema del método completo.

Las recuperaciones fueron cuantitativas y se obtuvieron límites de detección y cuantificación entre 0.16 – 0.33 y 0.53 – 1.12 ng g<sup>-1</sup>, respectivamente, para suelos y entre 0.16-0.27 y 0.53-0.79 ng g<sup>-1</sup> para los sedimentos, como se refleja en la tabla 23.

Finalmente, se analizaron con éxito distintos suelos agrícolas y forestales, así como sedimentos fluviales y marinos, y se encontraron varios de los analitos estudiados, especialmente MeP, cuya concentración fue más alta en sedimentos marinos. La confirmación de todos los resultados obtenidos se llevó a cabo mediante LC-MS/MS en las condiciones descritas en el trabajo anterior.

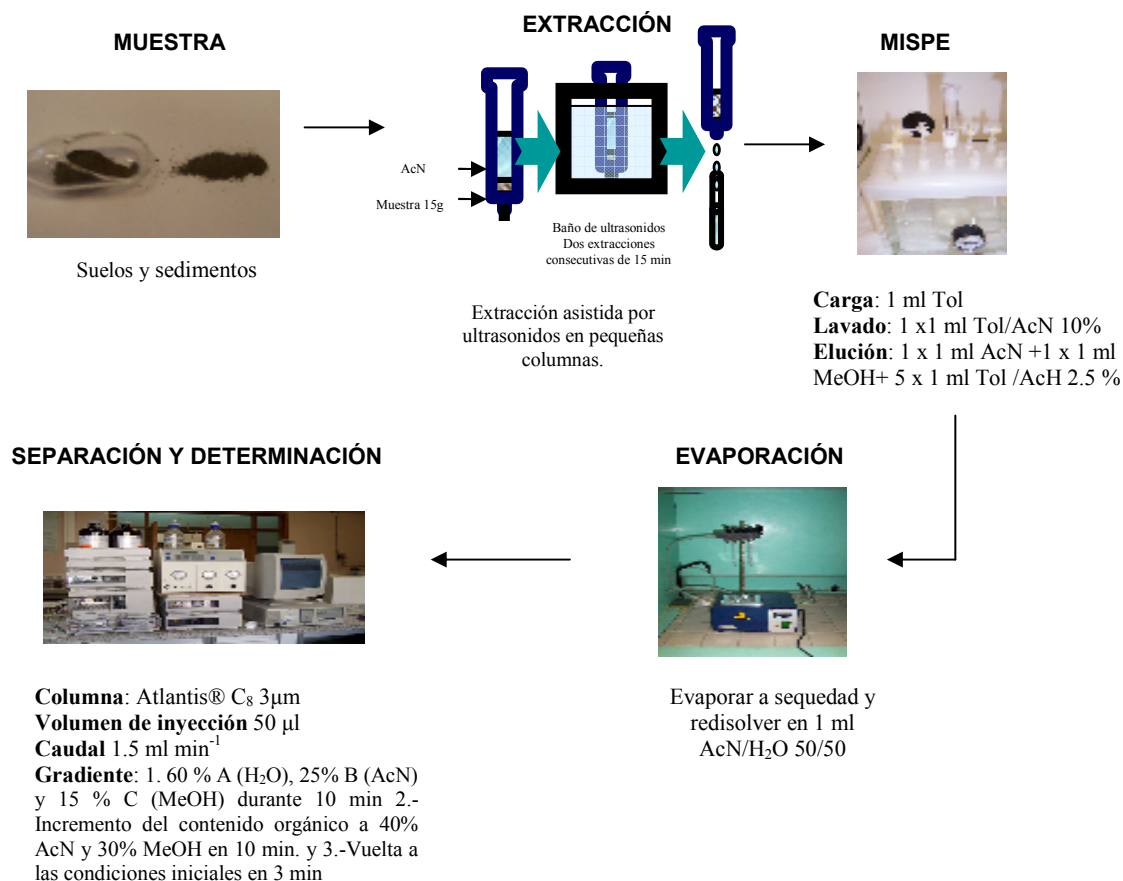


Figura 31. Esquema resumen del método utilizado para la determinación de MeP, EtP, iPrP, PrP, iBuP, BuP, BzP.

Tabla 23. Recuperaciones (%R), desviación estándar relativa (RSD), límites de detección (LD) y cuantificación (LC) de los nonilfenoles y sus derivados etoxilados en suelos y sedimentos.

Compuestos	Suelo				Sedimentos			
	%R <sup>a</sup>	RSD	LD ng g <sup>-1</sup>	LC ng g <sup>-1</sup>	%R <sup>a</sup>	RSD	LD ng g <sup>-1</sup>	LC ng g <sup>-1</sup>
<b>MeP</b>	83.2	5.3	0.33	1.12	88.0	3.2	0.27	0.89
<b>EtP</b>	86.8	5.2	0.21	0.69	85.5	4.1	0.20	0.65
<b>iPrP</b>	85.5	2.9	0.16	0.53	87.5	2.4	0.24	0.81
<b>PrP</b>	84.5	2.5	0.17	0.54	87.4	2.2	0.23	0.77
<b>iBuP</b>	82	3.4	0.27	0.89	87.2	3.7	0.24	0.79
<b>BuP</b>	86.4	7.2	0.30	1.02	85.6	2.5	0.16	0.53
<b>BzP</b>	80.2	2.4	0.29	0.95	88.1	3.2	0.18	0.61

<sup>a</sup> niveles de enriquecimiento: 0.5 ng g<sup>-1</sup> de cada uno de los analitos en estudio.

Este método se intentó emplear también para la determinación de parabenos en lodos, pero los resultados obtenidos no fueron tan satisfactorios como en el caso de suelos y sedimentos. Como se observa en la figura 32, aunque el MIP mejora la limpieza de los extractos, la selectividad no resulta suficiente para determinar los compuestos bajo estudio en este tipo de muestras.

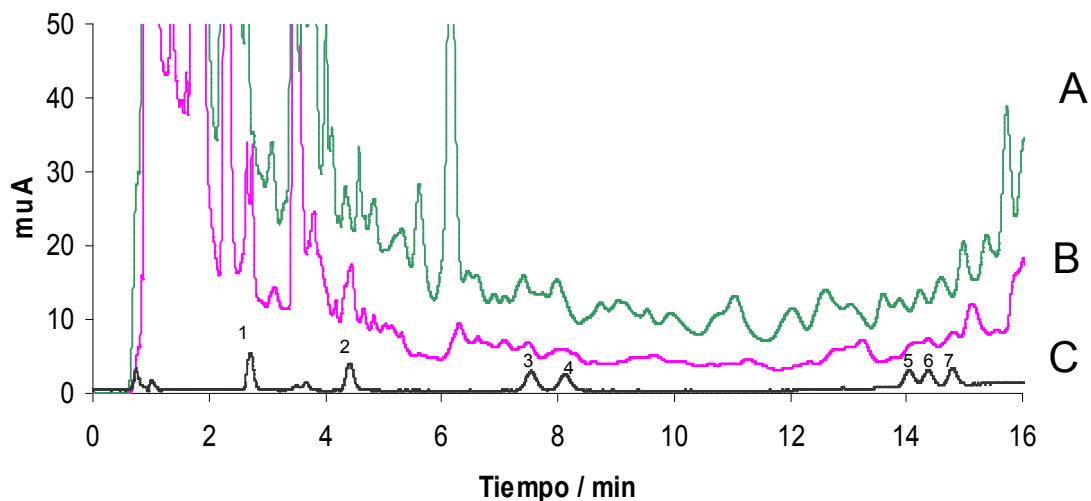


Figura 32. Lodos para uso agrícola A. Lodo enriquecido con  $15 \text{ ng g}^{-1}$  de MeP, EtP, iPrP, PrP, iBuP, BuP y BzP sin purificar con MISPE. B. Lodo enriquecido con  $15 \text{ ng g}^{-1}$  de MeP, EtP, iPrP, PrP, iBuP, BuP y BzP purificando con MISPE C. Patrón  $300 \text{ ng ml}^{-1}$  ( $15 \text{ ng g}^{-1}$ ).

## **IV. DISCUSIÓN INTEGRADORA**



#### IV. DISCUSIÓN INTEGRADORA

En la última década los denominados contaminantes emergentes se han convertido en uno de los objetivos de estudio prioritarios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Agencia de Protección Medioambiental (EPA). Por ello, el trabajo de investigación se enfocó hacia el desarrollo de métodos analíticos para la determinación conjunta por una parte de los nonilfenoles, incluyendo a la mezcla de isómeros (NP), el nonilfenol lineal (4-n-NP), los nonilfenoles etoxilados de cadena corta (NPEO<sub>1-2</sub>) y los nonilfenoles etoxilados de cadena larga (NPEO<sub>x</sub> x~9) y por otro lado la familia de los parabenos, metilparabeno (MeP), etilparabeno (EtP), isopropilparabeno (iPrP), propilparabeno (PrP), isobutilparabeno (iBuP), butilparabeno (BuP) y benzilparabeno (BzP), en muestras medioambientales tales como suelo, sedimentos, lodos y aguas residuales.

A continuación se van a discutir los distintos métodos desarrollados para ambas familias de compuestos.

##### **1. DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE NONILFENOL Y SUS DERIVADOS ETOXILADOS EN MUESTRAS DE INTERÉS MEDIOAMBIENTAL.**

Los nonilfenoles polietoxilados son compuestos mundialmente utilizados como surfactantes en detergentes, y los nonilfenoles, tanto la mezcla de isómeros como el nonilfenol lineal se utilizan como materia prima para su fabricación, así como en la industria textil y plástica. Como se ha visto previamente, en el medio ambiente es posible encontrar altas concentraciones de nonilfenol y de sus derivados etoxilados de cadena corta, los cuales presentan una alta toxicidad al presentar actividad como alteradores endocrinos. La legislación actual a nivel europeo versa únicamente sobre los usos y comercialización de estos compuestos, pero apenas desarrolla cuestiones medioambientales, a excepción de Dinamarca y Suiza que sí presentan legislación al respecto. Esta falta de legislación provoca que en las plantas de tratamiento de aguas las concentraciones encontradas de estos compuestos sean muy altas tanto en los efluentes como en los lodos, y ambos se utilizan habitualmente en agricultura provocando así la llegada de estos contaminantes al medio ambiente.

Los compuestos más tóxicos son los nonilfenoles y sus derivados etoxilados de cadena corta. Sin embargo, la determinación de los derivados etoxilados de cadena larga es también de interés, ya que como se ha visto, estos compuestos se degradan fácilmente al nonilfenol y los derivados de cadena corta.

### 1. 1. Capítulo I.

Existe gran variedad de métodos para la determinación del nonilfenol, y sus derivados etoxilados por separado en distintas muestras medioambientales. Sin embargo, hasta la fecha de realización de este trabajo, no había ningún artículo en el que determinaran de manera conjunta. Por ello, el objetivo de este primer trabajo fue desarrollar un método multiresiduo de determinación de nonilfenoles polietoxilados de cadena larga (NPEO<sub>x</sub>  $3 \leq x \leq 13$ ), nonilfenoles polietoxilados de cadena corta (NPEO<sub>1</sub> y NPEO<sub>2</sub>) y nonilfenol lineal (4-n-NP) en un único análisis utilizando técnicas asequibles y disponibles en cualquier laboratorio de rutina.

La separación y determinación final de los compuestos se realizó mediante HPLC con un detector de fluorescencia a  $\lambda_{ex}$ : 222 nm y  $\lambda_{em}$ : 305 nm. Al tratarse de compuestos aromáticos la fluorescencia presenta una selectividad mayor que la absorción ultravioleta. Inicialmente se optó por trabajar con una columna C<sub>18</sub> y se probaron distintos gradientes y disolventes orgánicos de mayor o menor polaridad y poder de elución (tetrahidrofurano, acetonitrilo o metanol), a fin de conseguir la separación de los derivados etoxilados de cadena larga. Tras analizar los resultados obtenidos se pudo concluir que a medida que aumentaba el número de grupos etoxi, las diferencias de polaridad entre los compuestos disminuían, siendo imposible la separación de los derivados etoxilados de cadena larga empleando una columna C<sub>18</sub>.

En un trabajo llevado a cabo por Shao y col. (2002), se empleó con éxito una columna de sílice para la separación de los derivados etoxilados de cadena larga. Por ello, y dados los resultados obtenidos en fase inversa con una columna C<sub>18</sub>, se estudió la posibilidad de llevar a cabo la separación mediante HPLC en fase normal. Con este tipo de columna y una fase móvil AcN/H<sub>2</sub>O (80/20), se consiguió la separación de los derivados etoxilados de cadena larga hasta línea base, sin embargo el 4-n-NP y el NPEO<sub>1</sub> y NPEO<sub>2</sub> co-eluían. Se realizaron distintas pruebas aumentando el contenido de

acetonitrilo de las condiciones iniciales, hasta un 100%, con el fin de intentar la separación de los compuestos más tóxicos (4-n-NP, NPEO<sub>1</sub> y NPEO<sub>2</sub>). En ninguna de las condiciones estudiadas caso se pudo evitar la co-elución de estos compuestos.

La tercera alternativa evaluada fue el empleo de una columna C<sub>8</sub>, que si bien supone también trabajar en fase inversa, la polaridad de la C<sub>8</sub> resulta intermedia entre C<sub>18</sub> y la columna de sílice. Al igual que en los casos anteriores se probaron distintas mezclas de agua con disolventes orgánicos, así como los modos de trabajo isocrático y con gradiente. Los mejores resultados se obtuvieron trabajando en modo isocrático con una mezcla AcN/H<sub>2</sub>O (60/40). Con el empleo de esta columna en estas condiciones, si bien se sacrificaba la resolución a línea base de los NPEO<sub>x</sub> de cadena larga, se consiguió no sólo la separación e identificación de los tres alteradores endocrinos (NP, NPEO<sub>1</sub> y NPEO<sub>2</sub>), sino también asignar los diferentes picos cromatográficos a los NPEO<sub>x</sub> de cadena larga entre x: 3 a 13, en menos de 25 min de análisis. Por ello se seleccionó este método como óptimo para la separación y determinación final de estos compuestos.

Como técnica de extracción se utilizó la extracción asistida por ultrasonidos en pequeñas columnas, llevándose a cabo la optimización de varios parámetros influyentes en la extracción. Una de las variables críticas en esta etapa resultó ser el empleo de agua tanto a efectos de mojado previo de la muestra como su presencia en la disolución extractante. Se sabe que, en algunos casos, la presencia de agua favorece la extracción de ciertos analitos, especialmente si éstos muestran un carácter mixto hidrofílico-hidrofóbico. Se pudo comprobar que el mojado de la muestra, 0.5 ml de agua por gramo de muestra, antes de la extracción asistida por ultrasonidos con metanol, tenía efectos positivos en el rendimiento de la extracción de los NPEO<sub>x</sub>, sin afectar en exceso al resto de los compuestos. Viendo cómo la presencia de agua favorecía la extracción de los compuestos más polares, se realizó un estudio exhaustivo del empleo de distintos porcentajes de agua en la mezcla de extracción con el metanol, de manera que se obtuvieran buenas recuperaciones para todos los compuestos en estudio. El empleo de una mezcla MeOH/H<sub>2</sub>O (70/30), incrementó casi al doble las recuperaciones de los derivados etoxilados de cadena larga, sin afectar a las recuperaciones del resto de los compuestos que ya eran cuantitativas. A continuación, se estudió el efecto del volumen, la temperatura, los ciclos de extracción y la cantidad de muestra, y se estableció como proceso de extracción definitivo, dos ciclos consecutivos de extracción

en baño de ultrasonidos utilizando un volumen de 5 ml de una mezcla MeOH/H<sub>2</sub>O (70/30) a 45 °C sobre 2 g de muestra. Las recuperaciones finalmente obtenidas fueron cuantitativas para todos los compuestos en las distintas muestras.

Posteriormente, y debido a la aparición de numerosos picos interferentes en los cromatogramas obtenidos mediante HPLC-FL se realizó un proceso de limpieza utilizando la extracción en fase sólida con C<sub>18</sub>. Este proceso también fue optimizado para obtener recuperaciones cuantitativas después de las etapas de extracción y limpieza.

El método completo se aplicó con éxito a la determinación de nonilfenoles polietoxilados de cadena larga (NPEO<sub>x</sub> 3 ≤ x ≤ 13), nonilfenoles polietoxilados de cadena corta (NPEO<sub>1</sub> y NPEO<sub>2</sub>) y nonilfenol lineal (4-n-NP) en suelos y sedimentos, las recuperaciones obtenidas para todos los compuestos fueron cuantitativas (R > 80%) y muy reproducibles (RSD < 14%). Los límites de detección y cuantificación se situaron entre 0.05-0.52 y 0.17-1.72 µg g<sup>-1</sup>, respectivamente, dependiendo del compuesto y el tipo de muestra, e inferiores a las concentraciones encontradas de estos compuestos en dichas matrices. Estas buenas características analíticas demostraron claramente la viabilidad del método desarrollado para el control de esta familia de compuestos en suelos y sedimentos.

Este mismo método se intentó aplicar a muestras de lodos y compost, pero en ellas las recuperaciones obtenidas eran muy bajas, inferiores al 40%. Sin embargo, y dado que las RSD eran inferiores a 20%, el método se propuso como método de *screening* para estas muestras.

## 1. 2. Capítulo II.

Debido a los problemas encontrados en el trabajo anterior, el segundo trabajo de esta memoria se enfocó a la elaboración de un nuevo método analítico apropiado para la determinación de 4-n-NP, NP, NPEO<sub>1</sub>, NPEO<sub>2</sub> y NPEO<sub>x</sub> 3 ≤ x ≤ 13 en lodos. Los lodos son matrices que presentan un alto contenido en materia orgánica, y distintos estudios muestran que la interacción de los nonilfenoles con dicha matriz es muy fuerte (K<sub>d</sub> muy

elevadas), por lo que es necesario emplear técnicas de extracción muy energéticas para su aislamiento.

Siguiendo un trabajo realizado por Foukulakis y col. en 2002, se utilizó la extracción asistida por microondas para la extracción de los compuestos bajo estudio. Al igual que el ultrasonidos, este tipo de extracción no es selectiva, por lo que además de los compuestos de interés también se extraen muchos otros compuestos que resultan interferentes a la hora de la separación y determinación final con las técnicas existentes en laboratorios de análisis de rutina, como HPLC-FL utilizado en este trabajo. Con el fin de eliminar dichas interferencias, la investigación se orientó hacia el desarrollo de un método de limpieza selectivo para nonilfenoles basado en el reconocimiento molecular, se decidió emplear los polímeros de impresión molecular (MIPs) dadas las buenas características que han demostrado tener estos materiales en análisis ambiental (Caro y col., 2006).

Se sintetizaron una serie de polímeros de impresión molecular utilizando como técnica la polimerización por precipitación y utilizando para todos ellos como compuesto plantilla el 4-n-NP. La polimerización por precipitación se realiza bajo altas condiciones de dilución ( $< 5\%$  w/v monomero/porogen) y por lo general se obtienen partículas esféricas de diámetro aproximado de  $1 \mu\text{m}$ . Para obtener partículas de mayor tamaño es necesario ajustar los parámetros de solubilidad del entrecruzante con el de los disolventes. Así, por ejemplo, utilizando como porogen AcN/Tol 75/25 y divinilbenceno como entrecruzante (parámetros de solubilidad del acetonitrilo, tolueno y divinilbenceno de 24.6, 18.6 y 17-18 Mpa respectivamente) se han llegado a obtener partículas con diámetros de  $5 \mu\text{m}$  (Wang y col., 2003). La utilización de un porogen distinto puede provocar la no formación de partículas o dar lugar a aglomerados de partículas.

Teniendo en cuenta todos estos factores se prepararon los distintos polímeros, en los que, como se ha comentado anteriormente, se utilizó el 4-n-NP como compuesto plantilla y como monómeros el MAA y la 4-VP, ambos con capacidad de interaccionar con la plantilla por puentes de hidrógeno. Como porogen, en principio se utilizó una mezcla de acetonitrilo/tolueno (75/25, v/v). Una vez obtenidos los distintos polímeros,

se situaron 200 mg de cada material en cartuchos de extracción en fase sólida para su posterior evaluación.

Los polímeros sintetizados empleando 4-VP como monómeros, no dieron buenos resultados ya que las interacciones no específicas fueron siempre comparables a las específicas, por lo que las recuperaciones obtenidas tanto en el MIP como en el NIP fueron muy similares en todas las condiciones de carga, lavado y elución estudiadas. Por tanto, para estos polímeros no se pudo demostrar la presencia de sitios de unión específicos.

Por otra parte, las recuperaciones obtenidas con los polímeros preparados con MAA como monómero fueron muy bajas, independientemente de las condiciones de carga y lavado utilizadas. Estos resultados pueden deberse a que las interacciones entre el monómero y el 4-n-NP no eran muy fuertes, pero no sólo en la etapa de carga, sino también durante la síntesis del polímero, en la que se utilizó como porogen una mezcla acetonitrilo/tolueno (75/25, v/v). El acetonitrilo puede debilitar los enlaces por puentes de hidrógeno entre el monómero y molécula plantilla, lo que en el caso de los compuestos en los que no está muy favorecida la formación de este tipo de interacciones, como es el caso del 4-n-NP, puede ser un impedimento para la síntesis de los MIPs. Por lo que considerando este punto, se decidió preparar un nuevo polímero utilizando tolueno puro como porogen, para de esta manera aumentar las interacciones plantilla:monómero. Sin embargo el tamaño de partícula obtenido fue muy pequeño, por lo que fue necesario preparar un nuevo polímero disminuyendo el volumen de porogen (concentración de MAA en tolueno (6.7% w/v)). El MIP así obtenido fue evaluado para su utilización en la extracción en fase sólida (MISPE) y se optimizaron las etapas de carga, lavado y elución. La presencia de sitios de unión específicos quedó claramente demostrada ya que se obtuvieron recuperaciones cuantitativas para el MIP e inferiores al 20 % para el NIP.

Finalmente, por tanto, el polímero elegido fue el preparado con ácido metacrílico (MAA) y un volumen de 6 ml de Tol (6.7 % w/v). Los resultados obtenidos fueron muy satisfactorios no sólo para el compuesto plantilla (4-n-NP), si no también para la mezcla de isómeros (NP) y los derivados etoxilados de cadena corta NPEO<sub>1</sub> y NPEO<sub>2</sub>. Los nonilfenoles etoxilados de cadena larga no pudieron ser determinados en este trabajo

debido fundamentalmente a dos factores. El primero de ellos fue que debido a la mayor polaridad de estos compuestos, las interacciones no específicas eran muy importantes no encontrándose diferencias entre el NIP y el MIP. Por otro lado, la influencia del tamaño molecular en la retención en los MIPs ya ha sido demostrada por varios autores (Álvarez-Lorenzo y col., 2004), por lo que es posible que el mayor tamaño de estos compuestos impidiera su llegada a los huecos específicos.

El proceso MISPE desarrollado se aplicó a la extracción selectiva del 4-n-NP, NP, NPEO<sub>1</sub> y NPEO<sub>2</sub>, en muestras de lodos, con las que, como se ha visto anteriormente, al utilizar técnicas de extracción convencionales, bien no se obtenían extracciones cuantitativas debido a la complejidad de la matriz o bien se obtenían extractos sucios difíciles de analizar. El uso de el proceso MISPE como etapa de limpieza permite obtener extractos libres de otros compuestos extraídos durante la etapa de extracción y que resultan interferentes a la hora de determinar los compuestos en estudio. El alto grado de limpieza obtenido con este proceso, permitió comprobar la presencia de 4-n-NP, NP, NPEO<sub>1</sub> y NPEO<sub>2</sub> en muestras no enriquecidas, confirmándose estos resultados mediante comparación con los espectros de los patrones, con muestras enriquecidas y finalmente mediante LC-MS/MS. Las recuperaciones para el MIP se encontraron entre 60-105% y los límites de cuantificación obtenidos mediante este método (MAE-MISPE-HPLC-FL) se situaron entre 1.6 y 4.7 mg kg<sup>-1</sup> dependiendo del compuesto y la muestra, un orden de magnitud inferior a los obtenidos para los sedimentos en el trabajo anterior.

Se encontraron altas concentraciones de los analitos en estudio en todas las muestras de lodos analizadas, procedentes todas ellas de plantas de tratamiento de aguas residuales de la Comunidad de Madrid. También se analizaron muestras de sedimentos de la Ría de Arousa y Pontevedra, y en este caso, al igual que en el trabajo anterior, no se encontró contaminación por parte de estos compuestos.

### **1. 3. Capítulo III.**

En este trabajo se optimizó un nuevo método para la determinación de NP y sus derivados etoxilados de cadena larga en aguas residuales basado en el empleo de la

técnica de cromatografía electrocinética micelar (MEKC) para su separación y determinación final.

Las técnicas de electroforesis capilar presentan una serie de ventajas con respecto al HPLC, entre las que destacan una mayor resolución y eficiencia de las separaciones, así como el menor consumo de disolventes orgánicos. Como en toda separación analítica se evaluaron y optimizaron los parámetros más influyentes con el fin de obtener la mejor resolución: las disoluciones reguladoras, el pH, los surfactantes micelares, el tiempo de inyección, modificadores orgánicos y la utilización de altas concentraciones de sales como técnica de *stacking*.

La selección del surfactante resultó crítica en este trabajo. Aunque el dodecilsulfato sódico (SDS) es el surfactante más comúnmente utilizado en MEKC, distintos estudios han mostrado que el colato sódico (SC) presenta una distinta selectividad, por lo que en este trabajo se evaluaron ambos surfactantes. En la figura 33 se representa la estructura tanto del SDS como del SC. El SDS había sido empleado con éxito en la separación de los derivados polietoxilados del octilfenol, sin embargo su empleo para la separación de los derivados polietoxilados del nonilfenol y el NP no dio buenos resultados. Se emplearon distintas concentraciones del mismo y diferentes electrolitos de fondo, pero en todos los casos se producía la coelución de los compuestos. Por ello, seguidamente se pasó a estudiar el efecto del empleo de colato sódico como surfactante. El SC es una sal biliar que presenta un esqueleto esteroico y que forma agregados helicoidales cargados y con grupos hidroxilo en disoluciones acuosas. La interacción que se produce entre los analitos y estos agregados es distinta a la que se puede producir en los surfactantes de cadena larga, debido al menor tamaño de los agregados, el diferente grado de hidrofobicidad/hidrofilicidad y a la solubilización de los compuestos. En el caso de los nonilfenoles, compuestos que presentan una baja solubilidad en agua, se comprobó que el uso de SC a una concentración de 50 mM permitía la separación no sólo del NP de sus derivados etoxilados, si no que también se conseguían separar los derivados etoxilados de cadena larga ( $\text{NPEO}_x$   $3 \leq x \leq 15$ ).

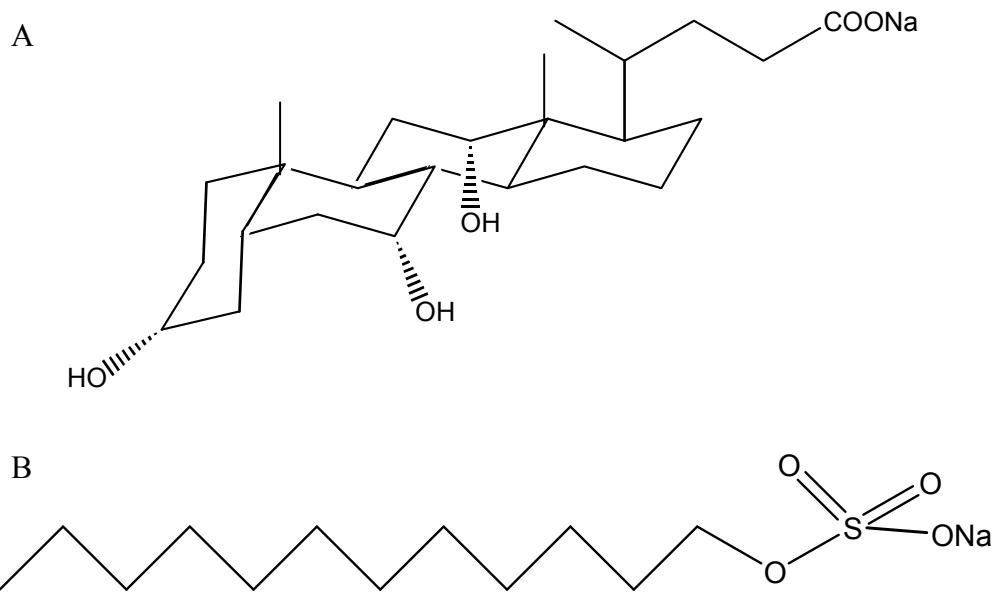


Figura 33. A. Estructura del colato de sodio (SC) y B. Estructura del dodecilsulfato sódico (SDS)

Por otro lado, también es importante destacar la influencia de la adición de NaCl a la disolución de muestra, tanto en la resolución obtenida como en la sensibilidad gracias al efecto *stacking*. En la figura 34 se representa un proceso de *stacking* por alta salinidad de la muestra. Cuando la conductividad de la muestra es mayor que la de la disolución reguladora, la velocidad de las micelas en la disolución reguladora es mayor que en la zona de muestra. Este hecho provoca la concentración de las micelas en la interfase de ambas zonas, lo que a su vez conlleva la concentración (*stacking*) de los analitos de la muestra.

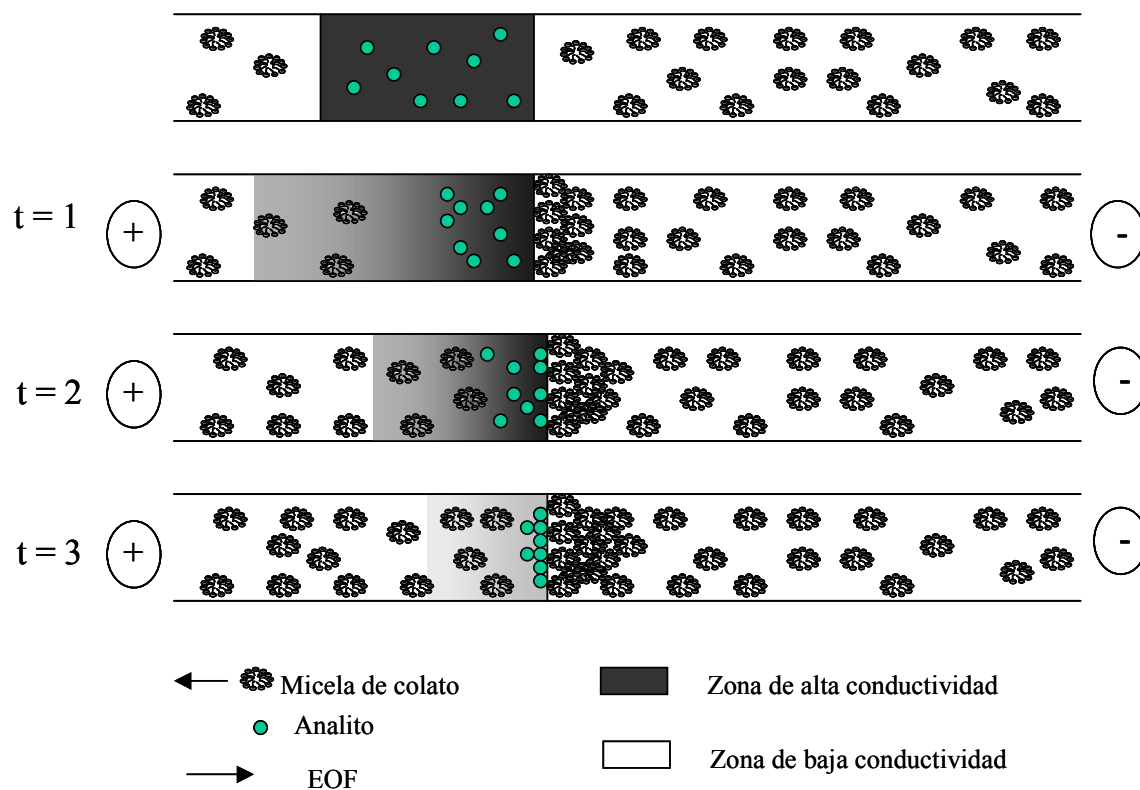


Figura 34. Mecanismo del proceso de *stacking* por alta salinidad de la muestra

Finalmente, las condiciones óptimas se obtuvieron empleando 2-[N-ciclohexilamino]etanosulfónico (CHES) (20mM, pH 9.1) en combinación con 50 mM de colato de sodio como surfactante en la disolución reguladora, junto con tiempos de inyección de 20 s y muestras preparadas en 50 mM NaCl. En estas condiciones se consiguió la separación de todos los compuestos hasta línea base, incluyendo a los 12 derivados etoxilados de cadena larga desde el trietoxilado hasta el que presenta 15 unidades de grupos etoxi en su estructura, lo cual, como se ha visto anteriormente, no se había logrado hasta el momento con esta técnica.

Por último, el método fue aplicado a la determinación del nonilfenol y sus derivados etoxilados de cadena larga en aguas residuales procedentes de dos etapas distintas del proceso de tratamiento de aguas de una planta situada en Helsinki (Finlandia). Para ello se llevó a cabo una extracción líquido-líquido utilizando como disolvente tolueno, y obteniéndose recuperaciones entre el 80-104% para cada uno de los compuestos. La presencia de NPEO<sub>9</sub> se observó en el agua procedente de la primera

etapa del tratamiento en concentración de 30 ng ml<sup>-1</sup> confirmándose este resultado posteriormente mediante LC-MS<sup>3</sup>.

Los límites de cuantificación del método (LLE-MEKC-UV) se situaron en el rango entre 12.7 y 30.8 ng ml<sup>-1</sup>, valores que se encuentran de acuerdo a las concentraciones normalmente encontradas en bibliografía para estos compuestos en las muestras seleccionadas y que demuestran la validez del método desarrollado.

## **2. DESARROLLO DE MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE PARABENOS EN MUESTRAS DE INTERÉS MEDIOAMBIENTAL.**

Como se ha comentado en la introducción, los parabenos son conservantes que se utilizan especialmente en productos de cuidado personal, aunque también están presentes en formulaciones farmacéuticas y alimentos envasados. Actualmente se encuentran en estudio sus posibles efectos tóxicos, y ya hay datos que confirman la presencia de estos compuestos en el medio ambiente. Es por ello que resulta necesario su control y, por tanto, la disponibilidad de métodos para su determinación en los distintos compartimentos medioambientales.

Esta segunda parte del trabajo se enfocó hacia el desarrollo de métodos analíticos para la determinación de estos compuestos en muestras sólidas medioambientales (suelos y sedimentos), para las que hasta la fecha no existía ningún trabajo previo en la bibliografía.

### **2. 1. Capítulo IV.**

En este trabajo, y dados los buenos resultados obtenidos para los nonilfenoles, la extracción de distintos miembros de la familia de los parabenos (MeP, EtP, iPrP, PrP, BuP y BzP) en suelos y sedimentos se llevó a cabo mediante extracción asistida por ultrasonidos en pequeñas columnas.

Inicialmente se seleccionó como técnica de separación y determinación el HPLC-DAD. Los compuestos en estudio presentaban distinta polaridad dependiendo de la longitud de la cadena alquílica. La mayor dificultad se encontró a la hora de separar

los isómeros isopropilparabeno y el propilparabeno, así como el butilparabeno y el bencilparabeno ya que presentaban una polaridad muy similar. La optimización de esta parte del trabajo se basó en diferentes métodos utilizados para el análisis en cosméticos (Borremans y col., 2003; Shen y col., 2007). Se optimizaron distintas variables con el fin de obtener la mejor separación y sensibilidad en el menor tiempo posible, entre ellas la longitud de onda, el tipo de columna o la fase móvil. En cuanto a la longitud de onda, se probaron 280 nm, 270 nm y 254 nm ya que habían sido utilizadas en otros trabajos anteriores y se observó que la mayor sensibilidad se alcanzaba a 254 nm, por lo que fue ésta la seleccionada para nuestro trabajo.

Se probaron distintas columnas utilizando como fase móvil H<sub>2</sub>O/THF/MeOH/AcN 60/5/10/25. Los primeros ensayos se realizaron con columnas Kromasil C<sub>18</sub> y Atlantis C<sub>18</sub> empleando caudales en el rango entre 1-1.5 ml min<sup>-1</sup>. Con ambas columnas se obtuvieron buenas separaciones, pero el tiempo de análisis superaba los 30 min y los picos obtenidos no estaban muy definidos. A continuación se probó la columna Zorbax C<sub>8</sub> (5 µm, 150 x 4.6 mm) con la misma fase móvil que las anteriores y un caudal de 1.5 ml min<sup>-1</sup>. En estas condiciones se consiguió la separación de todos los analitos en menos de 20 min, y además se obtuvo una mejor separación del butil y bencilparaben. Por lo que fue esta última columna la que se seleccionó.

Por último se analizaron diferentes fases móviles tanto en modo gradiente como isocrático, y finalmente se seleccionó como óptimo el siguiente programa de elución: (I) 60% H<sub>2</sub>O (A), 25 % AcN (B) y 15 % MeOH (C) durante 10 min, (II) posteriormente se incrementó la fase orgánica a 40% B y 30 % C en 10 min (III) volviendo a las condiciones iniciales en 3 min. Este modo gradiente permitía la separación de todos los compuestos en menos de 18 min.

Una vez optimizada la separación de los compuestos se procedió al desarrollo y puesta a punto del proceso de extracción. Se optimizaron diferentes parámetros de la extracción asistida por ultrasonidos en pequeñas columnas, al igual que en el capítulo I, como fueron el disolvente a utilizar, el número de ciclos de extracción y la cantidad de muestra. Finalmente se fijaron como valores óptimos una cantidad de muestra de 15 g de muestra y dos ciclos de 15 minutos utilizando como disolvente extractante 7 ml de acetonitrilo. Las recuperaciones así obtenidas fueron buenas, superiores en todos los

casos al 88%. Las características analíticas del método completo US-HPLC-DAD se evaluaron con distintas muestras (suelos y sedimentos). Si bien las recuperaciones y las RSDs obtenidas mediante este método fueron satisfactorias, los límites de detección no fueron los apropiados fundamentalmente debido a la falta de selectividad del detector (DAD).

Por ello, como primera alternativa se optó por el empleo de la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un espectrómetro de masas con triple cuadrupolo para la determinación final de los compuestos, a fin de mejorar la sensibilidad y selectividad de los análisis. En esta técnica, por lo general, para confirmar la presencia de los analitos en estudio se emplean dos parámetros como son el tiempo de retención y la abundancia relativa del ión precursor y de los iones producto. En el caso del isopropil y propilparabeno que son una pareja de isómeros que presentan el mismo precursor y productos fue necesario optimizar además otros parámetros como son la composición de la fase móvil y el caudal, ya que el parámetro determinante para su determinación fue el tiempo de retención. El uso del electrospray como interfase impedía que se pudiesen utilizar altos porcentajes de agua al disminuir la sensibilidad drásticamente lo que complicaba bastante dicha optimización. Se probaron distintos gradientes con agua (A) y metanol (B), utilizando como modificador formiato sódico (5 mM), el cual aumentaba la sensibilidad. Finalmente se seleccionó el siguiente gradiente: de 40 a 85% B en 10 min manteniéndolo constante 2 min y posteriormente reducir a 80% B en otros 2 min y a 78% B en 1 min, todo ello a un flujo constante de  $0.5 \text{ ml min}^{-1}$ .

El método desarrollado se aplicó finalmente al análisis de suelos de distinta procedencia y uso (forestales y agrícolas) así como de sedimentos procedentes tanto de la Ría de Pontevedra como de la de Arousa. En la mayoría de ellos se encontraron al menos uno de los compuestos estudiados aunque las concentraciones encontradas eran de pocos  $\text{ng g}^{-1}$ , entre los límites de cuantificación ( $<0.49 \text{ ng g}^{-1}$ ) y  $6.35 \text{ ng g}^{-1}$ .

## 2. 2. Capítulo V.

Es sabido que el empleo de la espectroscopía de masas en tandem incrementa notablemente el coste de los análisis y la instrumentación requerida no siempre se encuentra disponible en los laboratorios de rutina. Por ello, y como continuación del

trabajo anterior, la investigación se enfocó hacia el desarrollo de un método de tratamiento de muestra apropiado para la determinación de parabenos mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector ultravioleta (HPLC-UV), que se encuentra disponible en prácticamente todos los laboratorios de rutina. Como se vio en el trabajo anterior la determinación de estos compuestos requiere alcanzar bajos límites de detección, por lo que es necesario desarrollar un proceso de preparación de muestra muy selectivo. Por tanto, este último trabajo se basó en el desarrollo de un procedimiento MISPE que permitiera la determinación de MeP, EtP, iPrP, PrP, iBuP, BuP y BzP en muestras sólidas de interés medioambiental mediante HPLC-UV, utilizando la separación optimizada en el capítulo anterior. En lo referente a la extracción, ésta se realizó utilizando un baño de ultrasonidos con pequeñas columnas en las condiciones anteriormente optimizadas.

Para el desarrollo del procedimiento MISPE se sintetizaron diferentes polímeros, utilizando distintos monómeros y disolventes, pero en todos ellos se utilizó como compuesto plantilla el bencilparabeno (BzP). En un primer momento se prepararon dos polímeros con MAA (P1) y 4-VP (P2) respectivamente, y una mezcla acetonitrilo/tolueno (75/25) como disolvente. Una vez obtenidos los polímeros, se depositaron 200 mg de cada uno en cartuchos de extracción en fase sólida.

Para la evaluación de los polímeros, se comenzó realizando cargas del bencilparabeno utilizando como disolvente la mezcla acetonitrilo/tolueno (75/25). Sin embargo, y a pesar de ser este el disolvente empleado en la preparación del polímero, el compuesto plantilla apenas se retuvo en ninguno de los casos (P1 y P2). En cambio, con la utilización de tolueno como disolvente de carga la retención fue cuantitativa en ambos polímeros (superior al 80%), pero en este caso el problema residía en que las interacciones no específicas también eran muy altas. Para solucionar este problema se evaluaron distintos lavados con distintos disolventes y mezcla de ellos (acetonitrilo, tolueno y metanol) y se pudieron confirmar pequeñas diferencias entre los MIPs y NIPs, pero eran insuficientes como para ser empleados en un proceso de extracción MISPE.

A continuación se prepararon otros dos polímeros utilizando igual que en el caso anterior 4-VP (P3) y MAA (P4) como monómeros, pero tolueno como porogen. Ambos polímeros se evaluaron de manera análoga a la anterior. El comportamiento del

polímero 3 fue muy similar al de P1 y P2, sin embargo, el polímero 4 dio muy buenos resultados, ya que se observaban claras diferencias en las retenciones obtenidas en el MIP y el NIP, lo que demostraba la existencia de huecos específicos en el MIP. Este polímero, por tanto, fue seleccionado como óptimo, y se llevó a cabo la optimización del proceso MISPE empleando este material. Se optimizaron las etapas de carga (1 ml de tolueno), lavado (1 x 1 ml de tolueno y 1 x 1 ml tolueno/acetonitrilo (90/10)) y elución (1 x 1 ml acetonitrilo, 1 x 1 ml de metanol y 5 x 1 ml metanol con 2.5 % de ácido acético).

Con este polímero se obtuvieron muy buenos resultados, no sólo con el BzP (compuesto plantilla), si no también para el resto de los compuestos de la familia. Las recuperaciones fueron superiores al 80% para todos los parabenos y muestras estudiadas, y la capacidad del polímero fue suficiente para llevar a cabo los análisis a las concentraciones en las que se encuentran estos compuestos en muestras medioambientales. Los límites de cuantificación obtenidos con este nuevo método (US-MISPE-HPLC-UV) fueron del orden de  $1 \text{ ng g}^{-1}$ , un orden de magnitud inferiores a los obtenidos en el trabajo anterior (US-HPLC-UV) donde no se empleaba el procedimiento MISPE y comparables a los obtenidos utilizando US-HPLC-MS/MS, lo que demostraba la gran eficiencia de este procedimiento.

Se analizaron suelos y sedimentos de distinta procedencia y los resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos en el trabajo anterior, aunque hay que destacar las concentraciones de MeP encontradas en sedimentos marinos de una playa del Levante español, superiores a  $12 \text{ ng g}^{-1}$ , posiblemente debido a la presencia de este compuesto en la mayoría de las cremas solares.

Todas las muestras estudiadas se analizaron posteriormente mediante LC-MS/MS, utilizando el método descrito en el capítulo anterior, confirmando los resultados obtenidos mediante HPLC-UV y comprobando así la gran selectividad del MIP para la extracción de parabenos en suelos y sedimentos. Por tanto, se puede considerar el método desarrollado en este trabajo, US-MISPE-HPLC-UV, como una clara alternativa de bajo coste al LC-MS/MS para la monitorización de los parabenos en muestras sólidas de interés medioambiental.

**3. BIBLIOGRAFÍA.**

- Álvarez-Lorenzo, C.; Concheiro, A.; *Journal of Chromatography B*, **2004**, *804*, 231.
- Borremans, M.; Van Looc, J.; Roos, P.; Goeyens, L.; *Chromatographia*, **2003**, *58*, 1.
- Caro, E.; Marce, R.M.; Borrull, F.; Cormack, P.A.G.; Sherrington, D.C.; *TrAc Trends in Analytical Chemistry*, **2006**, *25*, 143.
- Fountoulakis, M.; Drillia, P.; Pakou, C.; Kampioti, A.; Stamatelatos, K.; Lyberatos, G.; *Journal of Chromatography A*, **2005**, *1089*, 45.
- Shen, H-Y.; Jiang, H-L.; Mao, H-L.; Pan, G.; Zhou, L.; Cao, Y-F.; *Journal of Separation Science*, **2007**, *30*, 48.
- Shao, B.; Hu, J-Y.; Yang, M.; *Journal of Chromatography A*, **2002**, *950*, 167.
- Wang, J.; Cormack, P.A.G.; Sherrington, D.C.; Khoshdel, E.; *Angewandte Chemie*, **2003**, *115*, 5494.

## **IV. CONCLUSIONES**



## V. CONCLUSIONES

A lo largo de la investigación recogida en esta memoria, se ha cubierto satisfactoriamente el objetivo principal de la misma: desarrollar métodos analíticos de elevada sensibilidad que permitan la determinación de nonilfenoles y parabenos en muestras de interés medioambiental de una forma rápida, sencilla y económica, siendo por tanto de fácil aplicación en cualquier laboratorio de análisis. Para ello, se han puesto a punto, validado, y aplicado a muestras reales distintos métodos analíticos basados en el empleo de la extracción asistida por ultrasonidos y polímeros de impresión molecular, así como en la utilización de la cromatografía líquida y cromatografía electrocinética micelar. Las conclusiones más relevantes de los trabajos realizados se resumen a continuación.

### **Capítulo I. Determinación de nonilfenoles y nonilfenoles etoxilados en muestras sólidas de interés medioambiental mediante extracción asistida por ultrasonidos y HPLC-FL.**

- Se ha conseguido desarrollar un método para la determinación de nonilfenoles polietoxilados de cadena larga (NPEO<sub>x</sub>  $3 \leq x \leq 13$ ), nonilfenoles polietoxilados de cadena corta (NPEO<sub>1</sub> y NPEO<sub>2</sub>) y nonilfenol lineal (4-n-NP) en un único análisis utilizando técnicas asequibles y disponibles en cualquier laboratorio de rutina. Este método combina un proceso de extracción asistida por ultrasonidos en pequeñas columnas seguido de limpieza y preconcentración por SPE, y determinación final por cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa.
- En lo relativo a la separación cromatográfica, se concluye que a medida que aumenta el número de grupos etoxi en la estructura de los NPEO<sub>x</sub>, las diferencias de polaridad entre ellos disminuyen, lo que dificulta especialmente su separación por HPLC.
- De las diversas columnas cromatográficas estudiadas, la C<sub>8</sub> fue la que proporcionó finalmente los mejores resultados, permitiendo no sólo la separación del 4-n-NP y los alteradores endocrinos NPEO<sub>1</sub> y NPEO<sub>2</sub> sino también la identificación de los NPEO<sub>x</sub> de cadena larga.

- En relación a la etapa extracción, se ha demostrado que el empleo de agua en la mezcla extractante tiene efectos muy positivos en la eficiencia de la extracción y permite obtener recuperaciones cuantitativas para todos los analitos bajo estudio, empleando únicamente 2 g de muestra y un volumen total de disolvente extractante de 10 ml .
- El empleo de cartuchos de C<sub>18</sub> en formato de extracción en fase sólida permite realizar una limpieza de extractos adecuada para el análisis de estos compuestos en suelos y sedimentos.
- Se han determinado las características analíticas del método propuesto y su aplicabilidad para el análisis de rutina tanto del 4-n-NP como de los NPEO<sub>x</sub> en suelos y sedimentos ha sido claramente demostrada.
- En cuanto a su aplicabilidad al análisis de muestras de lodos y compost, el método propuesto resulta muy adecuado como procedimiento de *screening* para detectar la presencia de esta familia de compuestos en dichas muestras.

## **Capítulo II. Polímero de impresión molecular para la extracción selectiva del nonilfenol y sus derivados etoxilados en muestras sólidas medioambientales.**

- Se ha desarrollado un método de preconcentración y limpieza selectiva de nonilfenoles y sus derivados etoxilados en extractos de muestras complejas mediante el empleo de polímeros de impresión molecular sintetizados para el 4-n-NP como compuesto plantilla
- El uso de 4-VP como monómero no resulta adecuado para la síntesis de MIPs para el nonilfenol, ya que las interacciones no específicas presentes en estos polímeros imposibilitan la comprobación de la presencia de sitios de unión específicos en la red polimérica.

- El empleo de MAA como monómero en concentración de 6.2% m/v con tolueno como “porogen” permite obtener polímeros de impresión molecular con sitios de unión selectivos que permiten la extracción no sólo del compuesto plantilla (4-n-NP) sino también del NP, NPEO<sub>1</sub> y NPEO<sub>2</sub> en extractos de lodos y sedimentos. Para los nonilfenoles polietoxilados de cadena larga, sin embargo, no se pudo demostrar reconocimiento específico.
- La combinación de la técnica extracción asistida por microondas junto con la extracción en fase sólida sobre polímeros de impresión molecular (MISPE) como etapa de limpieza hace posible superar los problemas encontrados en el trabajo anterior, permitiendo la determinación de 4-n-NP, NP, NPEO<sub>1</sub> y NPEO<sub>2</sub> en muestras de lodos y sedimentos mediante HPLC-FL. En el caso de los sedimentos, la mejora en los límites de cuantificación llega a ser de un orden de magnitud.
- Se analizaron varias muestras de lodos procedentes de distintas plantas de tratamiento de aguas de la Comunidad de Madrid, detectándose y cuantificándose en todas ellas distintas concentraciones de los analitos en estudio. Todos los resultados obtenidos se pudieron confirmar mediante LC-MS/MS, demostrando la gran selectividad del MIP y la validez del método desarrollado (MAE-MISPE-HPLC-FL) como clara alternativa y de menor coste para el control de estos contaminantes en muestras de lodos.

### **Capítulo III. Determinación de nonilfenoles y sus derivados etoxilados de cadena larga mediante cromatografía electrocinética micelar (MEKC).**

- Se ha demostrado la gran efectividad de la técnica MEKC como alternativa a la técnica HPLC para el análisis de los nonilfenoles polietoxilados de cadena larga y el NP, permitiendo llevar a cabo la separación a línea base de estos compuestos y su determinación en un tiempo inferior a 10 minutos.

- El empleo de colato de sodio (SC) como surfactante resulta mucho más adecuado para la separación de los nonilfenoles y sus derivados por MEKC que el SDS, a pesar de ser éste último es el surfactante más utilizado. El empleo de SC a una concentración 50 mM en 2-[N-ciclohexilamino] etanosulfónico (CHES) a pH 9.1 permite la resolución a línea base de todos los compuestos, lo que no se consiguió con SDS en ninguna de las condiciones estudiadas.
- Se ha demostrado que la técnica de concentración por alta salinidad de la muestra (*high salt stacking*) permite aumentar diez veces los tiempos de inyección, incrementando por tanto notablemente la sensibilidad de la MEKC para los analitos seleccionados.
- La combinación de la extracción líquido-líquido de estos compuestos con su separación-determinación final por MEKC-DAD permite el análisis del NP y sus derivados etoxilados en aguas residuales procedentes de depuradora a los niveles de concentración reales en los que aparecen estos compuestos en dichas muestras.
- Se analizaron muestras de aguas procedentes de distintas etapas del tratamiento encontrándose concentraciones de 30.1 ng ml<sup>-1</sup> de NPEO<sub>9</sub> en las muestras procedentes de la primera etapa.
- Todos los resultados obtenidos pudieron ser posteriormente confirmados con éxito mediante LC-MS<sup>3</sup>, demostrando la viabilidad del método desarrollado para el control de la concentración de estos compuestos en los efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales.

#### **Capítulo IV. Determinación de parabenos en muestras sólidas de interés medioambiental mediante extracción asistida por ultrasonidos y LC-MS/MS.**

- Se ha llevado a cabo una exhaustiva optimización de variables para conseguir la separación analítica de los distintos parabenos más utilizados actualmente

mediante cromatografía líquida en fase inversa. La separación de los isómeros isopropilparabeno y propilparabeno, así como la del bencilparabeno y butilparabeno presenta una gran dificultad, y requiere el uso de una fase móvil ternaria (H<sub>2</sub>O/AcN/MeOH) y elución en gradiente empleando una columna de C<sub>8</sub>.

- Se ha demostrado que la extracción asistida por ultrasonidos en pequeñas columnas puede ser también empleada como etapa de extracción en el análisis de parabenos en muestras de suelo y sedimentos, pudiéndose obtener recuperaciones cuantitativas para todos los compuestos tras llevar a cabo la optimización de variables de manera similar a la realizada en el capítulo I.
- Las características analíticas del método empleando el DAD como detector no resultaron satisfactorias, ya que, debido a la falta de selectividad de la detección ultravioleta, los límites de detección obtenidos estuvieron por encima de los niveles de concentración en los que se encuentran estos compuestos en suelos y sedimentos habitualmente (ng g<sup>-1</sup>).
- El empleo del espectrómetro de masas como detector permitió incrementar notablemente la selectividad y sensibilidad del método propuesto, disminuyendo considerablemente los límites de detección hasta alcanzar valores entre 0.05-0.12 ng g<sup>-1</sup> para los suelos y entre 0.04-0.14 y 0.11-0.49 ng g<sup>-1</sup> para los sedimentos dependiendo del compuesto.
- Se analizaron diversas muestras de suelos y sedimentos de distinta procedencia, encontrándose en todas ellas residuos de al menos uno de los compuestos analizados. Las concentraciones mayores correspondieron al MeP y PrP, los parabenos más ampliamente utilizados en la actualidad.

---

**Capítulo V. Polímero de impresión molecular para la extracción selectiva de parabenos en muestras sólidas medioambientales y posterior determinación con HPLC-UV.**

- Se ha llevado a cabo el desarrollo de un procedimiento de limpieza de muestra eficaz basado en el empleo de polímeros de impresión molecular, que permite realizar el análisis de parabenos en suelos y sedimentos por HPLC con detección ultravioleta, como alternativa de bajo coste al método utilizado en el capítulo anterior.
- Los resultados obtenidos en la optimización de la síntesis de los MIPs y desarrollo del proceso MISPE fueron muy similares a los obtenidos en el capítulo II, siendo el polímero obtenido empleando MAA como monómero y tolueno como porogen el que mostró mejores características en el reconocimiento selectivo posterior del analito plantilla (BzP).
- La selección del parabeno de mayor tamaño (BzP) como analito plantilla da lugar a un polímero con capacidad de reconocimiento selectivo para todos los parabenos estudiados, permitiendo el desarrollo de un proceso MISPE selectivo para esta familia de compuestos.
- La combinación del método de extracción asistida por ultrasonidos desarrollado en el capítulo IV con el empleo de la MISPE como técnica de limpieza, permite el uso de UV como detector en la determinación de MeP, EtP, iPrP, PrP, iBuP, BuP y BzP mediante HPLC, con límites de cuantificación un orden de magnitud inferior a los obtenidos sin realizar la limpieza, y similares a los alcanzados mediante LC-MS/MS.
- Se analizaron distintos tipos de suelos y sedimentos mediante el nuevo método propuesto, encontrándose en todos ellos alguno de los parabenos bajo estudio, y siendo más alta la concentración de MeP en los sedimentos marinos, posiblemente debido a extendido uso de este compuesto como conservante en cremas solares.

## **VI. ACRÓNIMOS**



## VI. ACRÓNIMOS.

**AcN:** Acetonitrilo.

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**AIBN:** 2,2'-azobisobutironitrilo.

**AIMN:** 2,2'-azobis-2-metilbutironitrilo

**APEO:** Aquil fenol etoxilado.

**AR:** Receptor de andrógeno.

**ASTM:** American Society Testing Method.

**ATP:** Trifosfato de adenosina.

**BSTFA:** N, O-bis-(trimetilsilil) trifluoroacetamida

**BuP:** Butilparabeno.

**BzP:** Bencilparabeno.

**CAPs:** Ácido 3-(ciclohexilamino)propanosulfónico.

**CAR:** Carboxen.

**CEC:** Electro cromatografía capilar.

**CFR:** Código federal de regulación.

**CHES:** Ácido 2-[N- ciclohexilamino]etanosulfónico.

**CIP:** Ciproxacina.

**DAD:** Diodo Array.

**DBT:** Dibutil ftalato.

**DCM:** Diclorometano.

**DDT:** Dicloro-difenil-tricloroetano.

**DES:** Dietilbestrol.

**DMF:** N,N- dimetilformaldehido.

**DVB:** Divenil benceno.

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético.

**EDMA:** Etilenglicol dimetacrilato.

**ELISA:** Inmunoensayo enzimático (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

**EPA:** Agencias de protección medioambiental.

**ER:** Receptor de estrógeno.

**EtP:** Etilparabeno.

**FDA:** Administración de Alimentos y Fármacos (Food and Drug Administration).

**FL:** Detector de fluorescencia.

**GC:** Cromatografía de gases.

**GCB:** Carbono grafitado.

**HPLC:** Cromatografía líquida de alta eficacia.

**iBuP:** Isobutilparabeno.

**iPrP:** Isopropilparabeno.

**LC:** Límite de cuantificación.

**LC<sub>50</sub>:** Concentración letal para el 50% de las población ensayada.

**LD:** Límite de detección.

**LLE:** Extracción líquido-líquido (Liquid-Liquid Extraction).

**LOEC:** Mínima concentración en la que se observan efectos.

**LVSS:** concentración de muestra en gran volumen (Large-Volume Sample Stacking).

**MAA:** Ácido metacrílico.

**MAE:** Extracción asistida por microondas (Microwave Assisted Extraction)

**MCF-7:** Células tumorales.

**MEKC:** Cromatografía electrocinética micelar.

**MeOH:** Metanol

**MeP:** Metilparabeno

**MIP:** Polímero imprintado (Molecularly Imprinted Polymer)

**MISPE:** Extracción en fase sólida sobre polímeros de impresión molecular (Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction).

**MS:** Espectrómetro de masas.

**MSPD:** Dispersión de la matriz en fase sólida (Matrix Solid-Phase Dispersion)

**MTBE:** Metil-terc-butyl-eter.

**MTBSTFA:** N-metil-N-(terc-butildimetilsilil)trifluoroacetamida.

**MSTFA:** N-Metiltrimetilsililtrifluoroacetamida.

**NACE:** Electroforesis capilar no acuosa

**NIP:** polímero no imprintado.

**NOEC:** Concentración sin efectos observados.

**NOR:** Nortiptilina

**NP-LC:** Cromatografía de líquidos en fase normal.

**NP:** Nonilfenol (mezcla de isómeros de cadena y posición).

**NPEO<sub>1</sub>:** Nonilfenol monoetoxilado

**NPEO<sub>2</sub>:** Nonilfenol dietoxilado

**NPEO<sub>x</sub>:** Nonilfenol polietoxilado.

**OMS:** Organización Mundial de la Salud.

**PA:** Poliacrilato.

**PBB:** Bifenilos Polibromados.

**PBDEs:** Éteres de polibromodifenilos.

**PCB:** Policlorobifenilos.

**PDMS:** polidimetilsiloxano.

**PFPA:** Ácido pentafluoropropionico.

**PLE:** Extracción con disolventes a alta presión (Pressurized Liquid Extraction).

**POPs:** Contaminantes orgánicos persistentes (Persistent Organic Pollutants)

**PrP:** Propilparabeno.

**PUF:** Espuma de poliuretano.

**PVC:** Cloruro de polivinilo.

**REACH:** Resgistration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemical Substances.

**RSD:** Desviación estándar relativa.

**SAX:** Intercambiador aniónico (Strong anion)

**SC:** Colato de sodio (Sodium Colate).

**SCCP:** Comité científico en materia de productos de consumo (Scientific Comité on Consumer Products).

**SCX:** Intercambiador cationico (Cation Exchanger).

**SDS:** Dodecil sulfato de sodio (Sodium Dodecil Sulfate).

**SFE:** Extracción con fluidos supercríticos (Supercritical Fluid Extracction).

**SPE:** Extracción en fase sólida (Solid Phase Extraction).

**SPME:** Microextracción en fase sólida (Solid Phase Microextraction).

**SULTs:** Sulfotransferasa.

**THF:** Tetrahidrofurano.

**TMCS:** trimetilcloro silano.

**TMIS:** Yoduro de trimetilsilano.

**TNPP:** Trisnonilfenol fosfito.

**TNT:** Trinitrotolueno.

**Tol:** Tolueno.

**TRIM:** Trimetilolpropano trimetacrilato.

**Tris:** Tris(hidroximetil)aminometano.

**UE:** Unión Europea.

**UHPLC:** Cromatografía líquida rápida de alta resolución.

**US:** Ultrasonidos.

**USEPA:** Agencia de Protección medioambiental de Estados Unidos.

**UV:** Detector ultravioleta.

**4-n-NP:** Nonilfenol lineal.

**4-VP:** 4- vinilpiridina.

**$\beta$ -CD:** Ciclodextrina formada por 7 unidades de glucosa.





Universidad Complutense de Madrid  
Facultad de Ciencias Químicas  
Departamento de Química Analítica

