

Determinación de irgarol 1051 y diuron en organismos marinos usando métodos de extracción acoplados a la cromatografía líquida con detector de espectrometría de masas.

Lia Gracy Rocha Diniz¹, Cristina Afonso-Olivares², María Esther Torres-Padrón², Sarah Montesdeoca-Esponda², Rayco Guedes-Alonso², Eny Maria Vieira¹, Teresa Cristina Rodrigues dos Santos Franco¹, Zoraida Sosa-Ferrera² & José Juan Santana-Rodríguez^{2*}

¹Laboratório de Química Analítica Ambiental e Ecotoxicologia. Instituto de Química de São Carlos - USP. Laboratório de Química Analítica e Ecotoxicologia -LAEC. Universidade Federal do Maranhão - UFMA

²Instituto Universitario de Estudios Ambientales y Recursos Naturales (i-UNAT), Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, 35017. Las Palmas de Gran Canaria (Spain).

RESUMEN

Irgarol 1051 y diuron son algunos de los biocidas más utilizados en pinturas y se ha demostrado que afecta negativamente a numerosos organismos marinos. En este trabajo se presenta la optimización y comparación de dos métodos de extracción: extracción asistida por microondas (Microwave Assisted Extraction, MAE) y extracción por ultrasonidos (Ultra Sound Extraction, USE), acoplados a cromatografía líquida con espectrometría de masas (LC/MS) para su determinación en moluscos. Los resultados obtenidos mostraron que MAE fue el método más efectivo para la extracción de estos compuestos biocidas, presentando recuperaciones aceptables y límites de detección (LODs) y cuantificación (LOQs) comparables con otros métodos. La precisión fue evaluada para distintos niveles de concentración (50, 100 y 250 ng·g⁻¹) obteniendo desviaciones menores al 12.0% (n = 6).

La aplicabilidad del método propuesto se evaluó en distintas especies de moluscos recogidas en playas de España y Brasil.

INTRODUCCIÓN

Las pinturas anti-incrustantes son una de las principales fuentes de contaminación marina. Pueden contener compuestos inorgánicos, orgánicos u organometálicos. Su función es prevenir el crecimiento y desarrollo de organismos incrustantes (biofouling), aumentar la eficiencia operativa de los barcos y garantizar la protección adecuada reduciendo los costes relacionados con los servicios de mantenimiento y el gasto de combustible [1].

La industria ha desarrollado revestimientos anti-incrustantes que incluyen, principalmente, compuestos orgánicos no metálicos como irgarol 1051 (2-metil-4-terc-butilamin-6 -ciclopropilamin-s-triazina) y diurón (N-(3,4-diclorofenil) -N, N-dimetil urea). El uso de ambos compuestos se ha incrementado en los últimos años [2] y también se conoce su toxicidad en algunas especies marinas así como la inhibición de su crecimiento a concentraciones de ng·L⁻¹ y µg·L⁻¹ [3, 4].

A pesar de que el uso de ambos biocidas ha sido restringido en algunos países europeos, se hace necesario recabar información sobre la presencia de estas sustancias en organismos marinos, como los moluscos. Por ello, es importante desarrollar nuevos métodos analíticos para la cuantificación de irgarol 1051 y diurón en matrices bióticas.

Debido a que estos compuestos están generalmente presentes a nivel de traza, son necesarios métodos de tratamiento de muestras (extracción, limpieza y preconcentración) que, acoplados a técnicas cromatográficas con sistemas de detección apropiados permitan su determinación a los niveles de concentración requeridos.

En este trabajo, hemos desarrollado y comparado dos métodos de extracción, la extracción asistida por microondas (MAE) y la extracción por ultrasonidos (USE) acoplados a cromatografía líquida (LC) con espectrometría de masas (MS) para la determinación de irgarol 1051 y diurón en tejidos blandos de moluscos. Se optimizaron los parámetros que afectan a ambas técnicas de extracción con el fin de obtener los mejores resultados, siendo MAE seleccionado para la determinación de los compuestos biocidas en organismos de São Luís - Maranhão (Brasil) y Gran Canaria (España).

MATERIAL Y MÉTODOS

Las especies de molusco seleccionadas para realizar el análisis de biocidas fueron *Monodonta turbinata* y *Stramonita haemastoma* procedente de las costas de las islas de Gran Canaria (España) y São Luís (Brasil),

respectivamente. Las conchas de los organismos se separaron, para realizar únicamente el tratamiento de tejidos blandos, que fueron sometidos a liofilización.

MAE se llevó a cabo con un microondas con rotor 6 EVAP y vasos 6 MF 100 PTFE (Anton Paar, Graz, Austria) mientras que para USE se utilizó un baño ultrasónico USC-100TH a 30 W y 45 kHz de frecuencia (VWR, USA).

Se usaron 100 mg de muestra para realizar ambos tipos de extracción. Todas las experiencias se realizaron por triplicado. Se introdujo la muestra en un volumen óptimo de disolvente y fue sometida a extracción por ultrasonidos o microondas aplicándole las condiciones óptimas. Finalmente, en ambos casos, la muestra se filtró y se llevó a sequedad para reconstituir con 1 mL de metanol, cuyo extracto fue analizado.

Para realizar la determinación de los compuestos se empleó un equipo de LC-MS con una fuente de ionización en electrospray (ESI) (Varian, Palo Alto, California). La muestra (10 μ L) se inyecta en el sistema a una velocidad de flujo de 0.2 ml \cdot min⁻¹, siguiendo el programa de gradiente que comienza con agua:metanol en una proporción de 60:40 % (v/v) y se mantiene durante dos minutos. Luego, alcanza porcentajes de metanol de 60, 70 y 100 % en 7, 9 y 11 min, respectivamente, y se mantiene durante un minuto para volver a las condiciones iniciales. El análisis tiene una duración de 15 min.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se evaluaron las variables que afectan a los procesos de extracción MAE y USE.

Para MAE se optimizaron la potencia del microondas, el tiempo de extracción y el volumen de extractante. Para determinar las condiciones óptimas se realizó un diseño experimental, 2³, para potencia (100 y 800 W), tiempo (2 y 6 min) y volumen (5 y 10 mL). Una vez estudiados los resultados de este diseño, se realizó una segunda malla con las variables que presentaron mayor influencia (potencia y tiempo) a tres niveles (diseño experimental 3²). Las condiciones óptimas para llevar a cabo la extracción fueron: 1000W de potencia durante 1 min, utilizando un volumen de 5 mL de metanol como extractante.

Por otra parte, en lo que respecta a USE, se evaluaron las dos variables que afectan a ésta: tiempo de extracción y el volumen de extractante. Para ello se realizó, al igual que para la extracción MAE, un diseño experimental de dos variables a tres niveles. Los mejores resultados se obtuvieron con 2.5 mL of metanol y 15 min de tiempo de ultrasonidos para ambos compuestos.

Como se puede comprobar en la Figura 1, las recuperaciones obtenidas con el método basado en microondas, variaron entre el 50 y el 70% aproximadamente para el diuron y fueron superiores al 80% para el irgarol 1051. Las recuperaciones del método de extracción basado en ultrasonidos fueron más bajas (entre el 20 y el 50% para el diuron y menores del 50%

para el irgarol 1051). Por todo ello se eligió como método óptimo la extracción asistida por microondas.

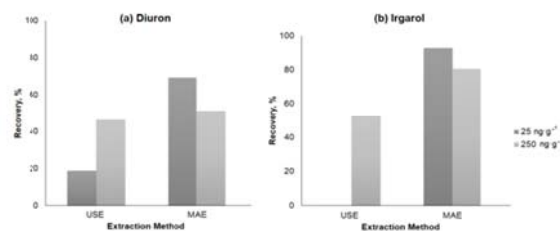


Figura 1. Recuperaciones obtenidas para (a) diuron y (b) irgarol 1051.

Una vez elegida la metodología óptima se calcularon los parámetros analíticos (linealidad, límites de detección y cuantificación y precisión).

Finalmente, la metodología fue validada en muestras reales de dos especies de moluscos gasterópodos marinos, concretamente *Monodonta turbinata*, procedente de las costas de Gran Canaria (España) y *Stramonita haemastoma* recogido en las costas de la isla de San Luis (Brasil), con buenos resultados.

AGRADECIMIENTOS

Lia G. R. Diniz agradece la financiación de CAPES (99999.012700/2013-04) y a los Dres. Eduardo Bessa Azevedo y Ana Luiza de Toledo Fornazari su aportación al diseño experimental de este trabajo.

REFERENCIAS

- 1 - Castro IB, Westphal E & Fillmann G, 2011. Tintas anti-incrustantes de terceira geração: novos biocidas no ambiente aquático. *Quim Nova*, 34: 1021-1031.
- 2 - Mochida K, Fujii K (2009) In: Arai T, Harino H, Ohji M, Langston WJ (ed) *Ecotoxicology of Antifouling Biocides*, 1rd edn. Springer, Tokyo.
- 3 - Haynes D, Ralph P, Prange, J., Dennison, B. (2000) The Impact of the Herbicide Diuron on Photosynthesis in Three Species of Tropical Seagrass. *Mar Pollut Bull*, 41: 288 - 293.
- 4 - Franco-Barrios A, Torres-Padrón, ME, Sosa-Ferrera Z, Santana-Rodríguez JJ. (2014) Development and Application of a Microwave-Assisted Extraction and LC/MS/MS Methodology to the Determination of Antifouling Booster Biocides in Sea Mulletts (*Mugil cephalus*) Organisms. *JAOC Int.*, 1: 197-204.