

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
Departamento de Química

TESIS DOCTORAL

**Combinación de Medios Moleculares Organizados con
Sistemas de Extracción y Microextracción en Fase
Sólida. Implementación en muestras sólidas de origen
marino y terrestre para la determinación de pesticidas
organoclorados**

Daura Vega Moreno

LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

ESPAÑA

2007



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
Departamento de Física

SALVADOR GALVÁN HERRERA, SECRETARIO DEL DEPARTAMENTO DE FÍSICA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

CERTIFICA:

Que el Consejo de Doctores del Departamento en su sesión de fecha 4 de octubre de 2007, tomó el acuerdo de dar consentimiento para su tramitación, a la tesis doctoral titulada **“COMBINACIÓN DE MEDIOS MOLECULARES ORGANIZADOS CON SISTEMAS DE EXTRACCIÓN Y MICRO-EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA. IMPLEMENTACIÓN EN MUESTRAS SÓLIDAS DE ORIGEN MARINO Y TERRESTRE PARA LA DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS ORGANOCOLORADOS”**, presentada por la doctoranda Dña. Daura Vega Moreno y dirigida por el Doctor José Juan Santana Rodríguez y la Doctora Zoraida Sosa Ferrera.

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Artº 73.2 del Reglamento de Estudios de Doctorado de esta Universidad, firmo la presente en Las Palmas de Gran Canaria, a 4 de octubre de 2007

Fdo.: Salvador Galván Herrera



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
Departamento de Química

MIGUEL ÁNGEL SUÁREZ DE TANGIL, DIRECTOR DEL
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD DE
LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

HACE CONSTAR:

Que la presente Memoria titulada **“COMBINACIÓN DE MEDIOS MOLECULARES ORGANIZADOS CON SISTEMAS DE EXTRACCIÓN Y MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA. IMPLEMENTACIÓN EN MUESTRAS SÓLIDAS DE ORIGEN MARINO Y TERRESTRE PARA LA DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS ORGANOCLORADOS”**, que presenta la doctoranda Dña. Daura Vega Moreno para optar al grado de Doctor Europeo por esta Universidad, ha sido realizada en los laboratorios del Departamento de Química de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Tras su registro y trámite autorizados por el Departamento, autorizo con esta fecha su presentación.

Y para que así conste a los efectos oportunos, en Las Palmas de Gran Canaria
a 4 de octubre de 2007

Fdo.: Miguel Ángel Suárez de Tangil

JOSÉ JUAN SANTANA RODRÍGUEZ, CATEDRÁTICO DE
UNIVERSIDAD DEL ÁREA DE QUÍMICA ANALÍTICA DE
LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
Y ZORAIDA SOSA FERRERA, CATEDRÁTICA DE ESCUE-
LA UNIVERSITARIA DEL ÁREA DE QUÍMICA ANALÍTICA
DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CA-
NARIA

HACEN CONSTAR:

Que la presente Memoria titulada **“COMBINACIÓN DE MEDIOS MO-
LECULARES ORGANIZADOS CON SISTEMAS DE EXTRACCIÓN
Y MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA. IMPLEMENTACIÓN
EN MUESTRAS SÓLIDAS DE ORIGEN MARINO Y TERRESTRE
PARA LA DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS ORGANOCLORA-
DOS”**, que presenta la doctoranda Dña. Daura Vega Moreno para optar al grado
de Doctor Europeo por esta Universidad, ha sido realizada en los laboratorios del
Departamento de Química de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria bajo
nuestra dirección.

El director

La Codirectora

La Doctoranda

Las Palmas de Gran Canaria, a 4 de octubre de 2007

La realización de esta Tesis Doctoral ha supuesto para mí una gran experiencia personal y profesional, y en estos cuatro años he recibido el cariño y apoyo de mucha gente. Ellos son los principales responsables de que esta tesis sea hoy realidad. A todos aquellos que han hecho que sea posible, gracias:

A mi madre, por tu amor, entrega y casi devoción, haber podido llegar hasta aquí es gracias a ti. A mi padre, por tu inagotable paciencia, por estar siempre ahí. A mi abuela, por enseñarme tantas cosas importantes que no se aprenden en la universidad. A toda mi familia, que siempre me ha apoyado, demasiado extensa para nombrarlos por separado.

A mis directores de Tesis, el Dr. José Juan Santana Rodríguez y la Dra. Zoraida Sosa Ferrera porque nadie me habría podido dar más oportunidades de aprender y crecer que ellos;

José Juan, tu creíste en mí y mis posibilidades desde el principio. Has sido el perfecto director, atento y amable a la vez que exigente. Me has ofrecido toda la ayuda, confianza y formación posible, incluido mi conocimiento de Europa. . . .

Zoraida, siempre aportando ideas brillantes a problemas sin aparente solución, sólo espero que se me haya pegado algo de tu talento.

A mis compañeros de laboratorio, a Miriam Torres, por tu cariño, apoyo y todas tus atenciones; Carolina Padrón, en mis primeros años fuiste mi mentora y yo debía ser tu sucesora, tarea nada fácil; Cristina Mahugo, por compartir tu experiencia y saber conmigo; Miguel, Álvaro, Rubén, Mercedes. . .

Con ellos he pasado la mayor parte del tiempo, compartiendo consejos, bromas, amistad y resultados, a veces éxitos y a veces desesperación.

A mis amigos, pasados y presentes, que siempre me han dado ánimos, confiado en mi más que yo misma, ustedes son los que nutren mi otra vida fuera de la universidad; no todo iba a ser ciencia!.

A todo el Departamento de Química, especialmente al Dr. Miguel Suárez, por tu apoyo incondicional, convirtiéndome junto al cariño del resto, en la “niña” del Departamento. Me he sentido muy arropada.

A todos los miembros de la Facultad de Ciencias del Mar, con ustedes empecé mi carrera y me han ayudado en mi desarrollo profesional.

A los miembros del PAS, Inma, Alejandro, Victor, Rito, Sergio. . . cada uno con una función diferente y de todos mucho que aprender.

Al servicio de limpieza, la otra Inma, mi segunda madre como dices tu.

Al Grupo de Cromatografía de la Universidad Rovira i Virgili de Tarragona, tanto a los jefes, Siscu, Eva, como a mis compañeros y amigos, Antonio, Marta. . . .

Al grupo de Química Medioambiental del Instituto de Estudios Ambientales (IVM) de la Vrije University, Amsterdam.

Al Ministerio de Educación y Ciencia, por la beca FPU (AP2003-2166) que ha permitido que me pudiese dedicar por entero a la realización de esta Tesis y por los proyectos del Plan Nacional de I+D+I N^o PPQ2002/04683 y CTQ2006-06507/BQU que la han financiado.

Índice general

Índice de Tablas	XVII
Índice de Figuras	XXI
I Introducción	3
1. Pesticidas	5
1.1. Insecticidas	6
1.1.1. El caso del DDT	8
1.2. Pesticidas Organoclorados	10
2. Surfactantes	17
2.1. Aplicaciones de los medios micelares	20
3. Técnicas de Extracción	25
3.1. Extracción por Microondas	25
3.1.1. Aplicaciones de la extracción asistida por microondas	33
3.1.2. Extracción asistida por microondas utilizando surfactantes	33
3.2. Microextracción en Fase Sólida (SPME)	35
3.2.1. Fundamentos teóricos de SPME	35

3.2.2. Procedimiento de SPME	38
3.3. Extracción en fase sólida (SPE)	46
3.3.1. Fundamentos de la SPE	46
3.3.2. Etapas de una extracción SPE	47
3.3.3. Retención y Elución	48
3.3.4. Capacidad y Selectividad	49
3.3.5. Tipos de fases	51
4. Objetivos del Trabajo	53
II Experimental	57
5. Aparatos y Reactivos	59
5.1. Aparatos Utilizados	59
5.1.1. Cromatografo Líquido de Alta Resolución	59
5.1.2. Microondas	60
5.1.3. Extracción en fase sólida	60
5.1.4. Sistema Soxhlet	61
5.1.5. Tratamiento Estadístico	61
5.2. Reactivos y Disoluciones	62
5.2.1. Reactivos	62
5.2.2. Disoluciones	64
6. Procedimientos Analíticos	65
6.1. Análisis Cromatográfico	65
6.2. Acondicionamiento de las muestras	66
6.3. Extracción micelar por microondas (MAME)	67

6.4. Microextracción en fase sólida (SPME)	68
6.5. Extracción en fase sólida (SPE)	68
6.6. Extracción Soxhlet	69
6.7. Mezclas de Surfactantes	70
6.8. Características de los suelos y fangos	70
6.8.1. Determinación del pH	72
6.8.2. Determinación de la Conductimetría	72
6.8.3. Granulometría – Determinación del Tamaño de Grano	72
6.8.4. Determinación del contenido en Materia Orgánica	73
III Resultados y Discusión	75
7. Extracción y Determinación de Pesticidas en Suelos y Fangos	77
7.1. Optimización y aplicación de MAME en suelos	78
7.1.1. Optimización de variables en la extracción MAME	78
7.1.2. Parámetros analíticos y validación	85
7.1.3. Aplicación de MAME a diferentes muestras de suelos	90
7.2. Optimización de MAME-SPME en suelos	97
7.2.1. Optimización de las variables en SPME	98
7.2.2. Parámetros analíticos y validación	103
7.2.3. Aplicación de MAME-SPME a muestras de suelos	107
7.3. Optimización de la extracción MAME en fangos	108
7.3.1. Optimización de las variables	108
7.4. Optimización de MAME-SPME en fangos	110
7.4.1. Optimización de las variables en SPME	110
7.4.2. Parámetros analíticos y validación	114

7.4.3.	Aplicación de MAME-SPME a muestras de fangos	117
8.	Extracción y Determinación en Muestras Biológicas	121
8.1.	Optimización y aplicación de MAME en algas	122
8.1.1.	Optimización de variables en la extracción MAME	122
8.2.	Optimización de MAME-SPME en algas	127
8.2.1.	Optimización del tiempo de absorción y desorción	128
8.2.2.	Parámetros analíticos	129
8.2.3.	Aplicación de MAME-SPME a muestras de algas	131
8.3.	Optimización de MAME-SPE en algas	132
8.3.1.	Optimización de las variables en SPE	132
8.3.2.	Parámetros analíticos y validación	137
8.3.3.	Aplicación de MAME-SPE a muestras de algas	141
8.4.	Optimización de MAME-SPE en moluscos	143
8.4.1.	Optimización de la potencia y tiempo de irradiación	144
8.4.2.	Parámetros analíticos y validación	146
8.4.3.	Aplicación de MAME-SPE a muestras de moluscos	149
IV	Conclusiones	151
V	Bibliografía	157
VI	Anexos	175
A.	Cromatografía	177
A.1.	Introducción	177

A.2. Condiciones cromatográficas para suelos	178
A.2.1. Curvas de Calibrado para la cuantificación en MAME	180
A.2.2. Curvas de Calibrado para MAME-SPME	181
A.3. Condiciones cromatográficas para fangos	182
A.3.1. Curvas de Calibrado para MAME-SPME	183
A.4. Condiciones cromatográficas para algas	184
A.4.1. Curvas de Calibrado para MAME-SPME	186
A.4.2. Curvas de Calibrado para MAME-SPE	187
A.4.3. Análisis de extractos Soxhlet	188
A.5. Condiciones cromatográficas para moluscos	188
B. Publicaciones y Congresos	191
B.1. Publicaciones	191
B.2. Comunicaciones a Congresos	193

Índice de tablas

1.1. Lista de pesticidas organoclorados estudiados	12
1.2. Propiedades físico-químicas de los pesticidas estudiados	14
3.1. Características de las principales técnicas de extracción	27
3.2. Tipos de fibra comercializados para su uso en SPME	41
6.1. Características de los suelos estudiados	71
6.2. Características de los fangos estudiados	71
6.3. Composición granulométrica de los suelos	73
6.4. Composición granulométrica de los fangos	73
7.1. Correlaciones entre variables	80
7.2. Valores de desviación estándar relativa (%) obtenida para la mezcla de seis pesticidas tras aplicar MAME	86
7.3. Límites de detección obtenidos para la mezcla de seis pesticidas tras aplicar MAME	87
7.4. Datos del material certificado CRM804-050	88
7.5. Extracción de pesticidas usando MAME en el material certificado CRM804-050	89
7.6. Áreas de pico obtenidas en el estudio del tipo de fibra	99

7.7. Valores de desviación estándar relativa (RSD) y límites de detección obtenidos (LOD) tras aplicar MAME-SPME	105
7.8. Validación del método MAME-SPME usando un material certificado	106
7.9. Valores de recuperación), desviación estándar relativa y límites de detección obtenidos tras aplicar MAME-SPME	116
7.10. Extracción de pesticidas usando MAME-SPME del material certificado CRM804-050	117
8.1. Correlaciones entre variables	123
8.2. Valores de recuperación, desviación estándar relativa y límites de detección obtenidos tras aplicar MAME-SPME	130
8.3. Valores de recuperación, desviación estándar relativa y límites de detección obtenidos tras aplicar MAME-SPE	139
8.4. Validación del método MAME-SPE con Soxhlet usando una mezcla certificada (Pesticide-Mix 5)	140
8.5. Valores de recuperación, desviación estándar relativa y límites de detección obtenidos tras aplicar MAME-SPE	148
8.6. Validación del método MAME-SPE con Soxhlet usando una mezcla certificada (Pesticide-Mix 5)	149
A.1. Lista de pesticidas organoclorados, longitudes de onda y tiempos de retención	179
A.2. Parámetros de las curvas de calibrado obtenidos utilizando POLE como extractante en el proceso MAME	180

A.3. Parámetros de las curvas de calibrado obtenidos en el proceso MAME- SPME utilizando POLE como extractante y la fibra SPME 60 μm PDMS-DVB	181
A.4. Lista de pesticidas organoclorados, longitudes de onda y tiempos de retención	182
A.5. Parámetros de las curvas de calibrado obtenidos en el proceso MAME- SPME utilizando POLE como extractante y la fibra SPME 60 μm PDMS-DVB	184
A.6. Parámetros de las curvas de calibrado obtenidos en el proceso MAME- SPME utilizando POLE como extractante y la fibra SPME 60 μm PDMS-DVB	186
A.7. Parámetros de las curvas de calibrado obtenidos en el proceso MAME- SPE utilizando POLE como extractante y el cartucho SPE Envirelut- Pesticide 500mg para algas	187

Índice de figuras

1.1. Bioacumulación del DDT en la cadena trófica	9
1.2. Fórmula química y estructura de los pesticidas estudiados	13
2.1. Esquema de localización de los analitos en el agregado micelar según su naturaleza	21
2.2. Estructura química de los surfactantes estudiados	22
3.1. Representación del proceso de extracción por microondas con utilización de surfactantes	34
3.2. Esquema del proceso SPME por inmersión directa	39
3.3. Clasificación de las fibras de SPME según si la extracción se produce por absorción o adsorción	42
3.4. Etapas en la utilización de un procedimiento de SPE	47
5.1. Cromatografo	59
5.2. Microondas	60
5.3. Estación SPE	60
5.4. Soxhlet	61
6.1. Zonas de recogida de muestras en la isla de Gran Canaria	66

6.2. Representación de MAME acoplado con SPE	69
7.1. Superficies de respuesta potencia-concentración para los surfactantes estudiados	82
7.2. Superficies de respuesta potencia-tiempo para los surfactantes estudiados	84
7.3. Cromatograma del extracto de suelo de Valleseco (mezcla cetil) . .	85
7.4. Cromatograma del extracto obtenido del material certificado . . .	89
7.5. Cromatogramas de los extractos sin acondicionar (A) y acondicionada (B) con pesticidas ($\lambda = 238nm$)	91
7.6. Recuperaciones obtenidas con la tierra de Sta Brígida para los cuatro surfactantes, las tres mezclas y el POLE	92
7.7. Recuperaciones obtenidas con las distintas tierras usando la mezcla stearyl como extractante	93
7.8. Recuperaciones obtenidas con Valleseco I a distintos tiempos de envejecimiento	96
7.9. Estudio del tiempo de absorción para mez. stearyl (A) y POLE (B)	100
7.10. Estudio del tiempo de desorción para mez.stearyl (A) y POLE (B)	101
7.11. Estudio de la temperatura de extracción para la mezcla stearyl (A) y POLE (B)	102
7.12. Estudio de la fuerza iónica del medio para la mezcla stearyl (A) y POLE (B)	103
7.13. Cromatograma del extracto de suelo de Valleseco I tras aplicar MAME-SPME	104
7.14. Recuperaciones obtenidas en los distintos suelos utilizando mezcla stearyl (A) y POLE (B)	107

7.15. Superficie de respuesta potencia-tiempo para el 4,4'-DDT	109
7.16. Influencia de los porcentajes de extracto MAME estudiados (v/v) .	111
7.17. Optimización del tiempo de absorción (A) y desorción (B)	112
7.18. Optimización de la agitación en la desorción (A) y el volumen de desorción (B)	114
7.19. Cromatograma del extracto de fango de Hoya Pozuelo utilizando MAME-SPME	115
7.20. Recuperaciones obtenidas con MAME-SPME para distintos fangos	118
7.21. Recuperación obtenida para distintos tiempos de envejecimiento . .	119
8.1. Superficie de respuesta potencia-concentración para el 4,4'-DDT .	125
8.2. Superficie de respuesta potencia-tiempo para el 4,4'-DDT	126
8.3. Optimización del tiempo de absorción (A) y desorción (B)	129
8.4. Recuperaciones obtenidas con MAME-SPME para distintas algas .	131
8.5. Elección del tipo de cartucho SPE	133
8.6. Optimización del volumen de absorción y dilución de la muestra .	134
8.7. Optimización de la composición de la disolución de lavado	135
8.8. Optimización del volumen de desorción de la muestra	136
8.9. Cromatograma del extracto de alga de <i>Ulva rigida</i> utilizando MAME- SPE	137
8.10. Recuperaciones obtenidas con MAME-SPE para distintas algas . .	141
8.11. Superficie de respuesta potencia-tiempo para el 4,4'-DDT	145
8.12. Cromatograma del extracto de mejillón utilizando MAME-SPE . .	146
8.13. Recuperaciones obtenidas con MAME-SPE para distintos moluscos	150
A.1. Cromatograma del extracto de suelo de Valleseco (mezcla cetil) . .	179

A.2. Cromatograma del extracto de fango de Hoya Pozuelo utilizando MAME-SPME	183
A.3. Cromatograma del extracto de alga de <i>Ulva rigida</i> utilizando MAME- SPE	185
A.4. Cromatograma del extracto de mejillón utilizando MAME-SPE . .	189

Abreviaturas

- **DDT:** Diclorodifeniltricloroetano
- **DDE:** Diclorodifenildicloroetileno
- **DDD:** Diclorodifenildicloroetano
- **EPA:** Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos
- **POPs:** Compuestos Orgánicos Persistentes
- **POLE:** Polyoxyethylene 10 Lauryl Ether
- **Stearil:** Polyoxyethylene 10 Stearyl Ether
- **Tridecil:** Polyoxyethylene 10 Tridecil Ether
- **Cetil:** Polyoxyethylene 10 Cetil Ether
- **HPLC:** Cromatografía Líquida de Alta Resolución
- **GC:** Cromatografía de Gases
- **MAE:** Microwave assisted extraction (Extracción asistida por microondas)
- **MAME:** Microwave assisted micellar extraction (Extracción micelar asistida por microondas)

- **SPE:** Solid Phase Extraction (Extracción en fase sólida)
- **SPME:** Solid Phase Microextraction (Microextracción en fase sólida)
- **PDMS:** Polidimetilsiloxano
- **DVB:** Divinilbenceno
- **PA:** Poliacrilato
- **CW:** Carbowax
- **CX:** Carboxen
- **MO:** Materia Orgánica
- **SD:** Desviación Estándar
- **RSD:** Desviación Estándar Relativa
- **LOD:** Límite de Detección Obtenido

I

Introducción

Pesticidas

La producción global de productos químicos ha aumentado en las últimas siete décadas de un millón a 400 millones de toneladas al año. Muchas de ellas han permitido la elaboración de productos y herramientas muy útiles al hombre pero no carentes de cierta toxicidad, por lo que actualmente su uso está prohibido o sujeto a cierta regulación [1, 2].

Tal es el caso de sustancias como los bifenilos policlorados (PCBs) o pesticidas como el DDT. Todos estos compuestos fueron sintetizados por el hombre obteniendo grandes beneficios derivados de su aplicación en industrias (como es el caso de los PCBs), o en la agricultura (como el DDT). La relativa sencillez requerida en el proceso de síntesis de estas sustancias y su posterior utilidad, hizo que se empleasen de forma masiva.

Los pesticidas ayudan a combatir los daños causados por la propagación de plagas, muy frecuentes con las técnicas agrícolas actuales, como el monocultivo. Se calcula que al menos el 10 % de la cosecha mundial es destruida por estos organismos mientras está almacenada. Durante el crecimiento de las cosechas se producen

también grandes pérdidas. Se estima que entre el 30 y el 40 % de las cosechas y la ganadería se pierde por las plagas [3].

Sin los pesticidas no se podría haber dado el gran aumento de producción de alimentos de la llamada “revolución verde”, que ha permitido alimentar, cada vez mejor, a una población mundial que ha ido creciendo continuamente. Su uso se multiplicó por 32 de 1950 a 1986. Los países en vías de desarrollo también los han ido empleando cada vez más y, en la actualidad, consumen la cuarta parte de este tipo de productos. Se calcula que por cada euro invertido en pesticidas el agricultor se ahorra pérdidas por valor de unos 3 a 4 euros [4].

Otra importante utilidad de los pesticidas ha sido la lucha contra epidemias, como el tifus o la malaria, transmitidas por insectos u otros parásitos humanos [5]. Son enfermedades que afectan a una elevada proporción de la población; se calcula que unos 100 millones de personas sufren de malaria en el mundo y que, gracias a los pesticidas, su propagación ha disminuido de forma muy importante.

Sin embargo, estas sustancias son muy tóxicas para los organismos, donde se acumulan, poseen una alta persistencia en el medio, y pueden biomagnificarse en la cadena trófica [6, 7].

1.1. Insecticidas

Los insectos son los que más plagas ocasionan. Escarabajos, orugas, moscas y mosquitos, y muchos otros tipos de insectos causan grandes daños en las cosechas y transmiten enfermedades. Más de la mitad de los pesticidas son del grupo de los insecticidas. Desde hace milenios los hombres utilizan sustancias como cenizas,

azufre, compuestos arsenicales, tabaco molido, cianuro de hidrógeno, compuestos de mercurio, zinc o plomo para luchar contra los insectos. Forman el grupo de los llamados insecticidas de la *1ª generación*. Son productos en general muy tóxicos, poco efectivos en la lucha contra la plaga y muy persistentes en el ambiente (hasta 50 años). Hoy día se usan muy poco y muchos de ellos están prohibidos por su excesiva toxicidad [8].

Los avances de la ciencia y de la industria química hicieron posible la aparición de mejores insecticidas, que se suelen denominar de la *2ª generación*. Son un variado conjunto de compuestos que se clasifican en grupos según su estructura química. Las tres familias más importantes son los organoclorados (clorocarbonados), los organofosfatos y los carbamatos.

Los **organoclorados** (DDT, aldrin, endrin, lindano, etc.) son tóxicos, su persistencia en el ambiente sin ser destruidos llega a ser de años y se bioacumulan, es decir, van aumentando su concentración al ir ascendiendo en la cadena trófica.

Los organofosfatos (malation, paration, etc.) son poco persistentes (días) y se eliminan en la orina. Muy tóxicos para el hombre, tanto como los más conocidos venenos como son el arsénico, la estricnina o el cianuro. Se usan mucho en agricultura.

Los carbamatos (por ejemplo el carbaril) son también poco persistentes (días) y se eliminan en la orina. Son poco tóxicos para el hombre pero menos eficaces en su acción como pesticidas que los organofosfatos. Se usan menos en agricultura y más en interiores, como insecticidas caseros.

1.1.1. El caso del DDT

El caso del DDT resulta especialmente interesante de analizar por ser muy representativo de los pros y contras de los insecticidas, especialmente de los más antiguos. Algún autor ha llegado a titular su capítulo sobre este producto como “Una historia de beneficios olvidados y de ingratitud social”.

Químicamente el DDT es el 2,2-bis-(p-clorofenil)-1,1,1-tricloroetano y fue el primero de los insecticidas sintetizados de la llamada 2^a generación. Había sido sintetizado en 1874 pero su uso como insecticida comenzó en 1939 cuando el químico suizo Müller descubrió sus propiedades como veneno para los insectos y su baja toxicidad para los humanos. Este científico recibió el Premio Nobel en 1948 en reconocimiento al impresionante avance que este producto había representado en la lucha contra las enfermedades y las plagas. Se calcula que en los primeros años de uso del DDT se evitó la muerte de 5 millones de personas cada año, además de la protección de cosechas y del aniquilamiento de insectos domésticos. Así, por ejemplo, en la India, en 1952 hubo 75 millones de casos de malaria y en 1964, después de usar masivamente el DDT, 100.000 casos.

Pero conforme se fueron descubriendo algunos importantes problemas asociados a su aplicación, empezó a ser cada vez menos usado. La máxima producción de este insecticida se produjo en 1970 y a partir de entonces se fue prohibiendo su uso, cada vez en más países, y descendiendo su producción. El motivo de este declinar del favor social del DDT fueron los graves problemas que se detectaron. En primer lugar es un producto de lenta conversión a sustancias no tóxicas en la naturaleza, su persistencia media es de unos 3 años. Además es muy poco soluble

en agua, lo que hace que no se elimine en la orina, y es muy soluble en grasas, por lo que se acumula en tejidos de los organismos [9]. Por estos motivos se va acumulando a lo largo de la cadena trófica [10, 11]. Así, por ejemplo, el DDT que se extendía sobre un cultivo, se encontraba en una concentración bajísima en las plantas; pero en los insectos que se alimentaban de estas plantas estaba ya en concentraciones diez veces mayores. Si el insecto resiste al DDT será comido por ranas, por ejemplo, en las que el DDT alcanzará concentraciones 100 veces mayores que las de las plantas; y las rapaces que comen a las ranas llegan a tener concentraciones 1000 veces mayores.

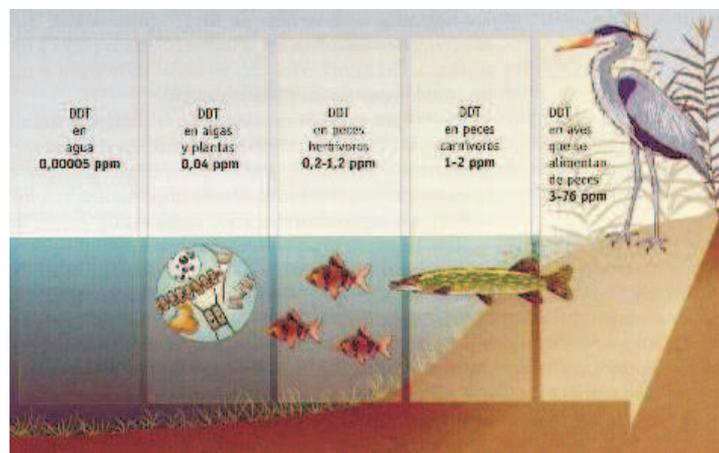


Figura 1.1: Bioacumulación del DDT en la cadena trófica

Uno de los principales efectos de estas altas concentraciones de DDT fue sobre la reproducción de las aves, porque sus huevos tenían unas cáscaras extraordinariamente finas y frágiles, y muchos se rompían durante la incubación. De esta forma, las poblaciones de algunas especies de aves disminuyeron de forma alarmante.

Otro importante problema fue que muchos organismos desarrollaron resistencia, y para luchar contra ellos había que emplear cantidades cada vez mayores

del producto y con menor eficacia. De ser beneficioso para la humanidad pasó a ser perjudicial entre los años 1970 a 1980 y con ello llegó su prohibición. Aunque, afortunadamente, su desuso coincidió con el desarrollo de nuevos insecticidas con características mucho menos peligrosas.

1.2. Pesticidas Organoclorados

Los pesticidas organoclorados son eficaces contra una gran variedad de insectos. El hexaclorobenceno y el pentaclorofenol se han utilizado principalmente como fungicidas, mientras que el diclorodifeniltricloroetano (DDT) es un insecticida que inicialmente fue utilizado por los militares para protegerse contra los mosquitos portadores de enfermedades [12].

Estos compuestos químicos se empezaron a utilizar en 1940 y hoy en día son raramente utilizados en los países desarrollados debido a su tendencia a permanecer en el medio ambiente, pero todavía se siguen utilizando en otros países, especialmente para el control de la malaria [13]. La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) prohibió el uso de muchos de estos compuestos químicos durante 1970 y 1980 [14], pero aún se puedan encontrar en diferentes regiones altas concentraciones de los mismos, debido a su alta permanencia en el medio ambiente [15, 16].

Los pesticidas organoclorados son compuestos tóxicos que afectan a la salud humana y al medio ambiente. Debido a que estos compuestos pueden transportarse por el viento y el agua, pueden afectar a personas y vida salvaje en zonas muy alejadas del país donde se estén produciendo y usando [17, 18].

Los pesticidas organoclorados se dispersan en el medio ambiente a partir de la acumulación de desechos contaminados en los vertederos de basura, de la polución causada por los incineradores de basura y de la liberación de gases en las fábricas que producen estos compuestos químicos. En los sistemas acuáticos, los pesticidas organoclorados se absorben en sedimentos, que luego se bioconcentran en los peces [19] y en los mamíferos marinos [20, 21].

Estos pesticidas pertenecen al grupo de compuestos orgánicos persistentes (POPs), manteniéndose por largos períodos de tiempo en el medioambiente. Su naturaleza lipofílica, su hidrofobicidad, bajo peso molecular y bajas tasas de degradación favorecen la bioacumulación de los mismos en los tejidos biológicos [22], con la consiguiente biomagnificación de las concentraciones en los organismos a medida que pasan de unas especies a otras, ascendiendo en la cadena trófica [23, 24]. Este hecho tiene consecuencias perjudiciales para los humanos al ingerir alimentos que pueden contener altas tasas de contaminación [25].

Este fenómeno, unido a su alta permanencia, hace que el tiempo de vida media de estos compuestos en los diferentes tipos de matrices sea muy alto y que a pesar de estar prohibidos en los países desarrollados, aún se puedan encontrar en altas concentraciones en organismos y en el medioambiente [26, 27].

Los pesticidas organoclorados constituyen un único tipo de pesticidas debido a su estructura cíclica, a su número de átomos de cloro y a su baja volatilidad. Pueden clasificarse en cuatro categorías:

- diclorodifeniletanos (ej. DDTs)
- ciclodienos (ej. Aldrin y Dieldrin)

- bencenos clorados (ej. Hexaclorobenceno [HCB])
- ciclohexanos (ej. hexaclorociclohexano [HCH])

Los pesticidas objeto de este estudio representan algunos de los pesticidas organoclorados más ampliamente usados. Todos ellos pertenecen a la lista de las 12 sustancias prioritarias para la Agencia de Protección Medioambiental (EPA) [28], denominada la ‘docena sucia’. Estos pesticidas son derivados del DDT, aldrín y dieldrín (Tabla 1.1).

Compuesto	Abreviatura
4,4'-Dichlorodiphenyltrichloroethane	4,4'-DDT
4,4'- Dichlorodiphenyldichloroethylene	4,4'-DDE
4,4'-Dichlorodiphenyldichloroethane	4,4'-DDD
2,4'-Dichlorodiphenyltrichloroethane	2,4'-DDT
Dieldrin	Dieldrin
Aldrin	Aldrin

Tabla 1.1: Lista de pesticidas organoclorados estudiados

La fórmula química y estructura de los pesticidas objeto de este estudio se representan en la Figura 1.2.

Los pesticidas organoclorados son sustancias estables y liposolubles que pueden contaminar alimentos de consumo humano y producir efectos nocivos cuando éstos son ingeridos [29, 30]. Las propiedades fisicoquímicas de los compuestos son importantes para establecer la toxicidad y alcance de los mismos, en especial en aquellas sustancias consideradas como posibles contaminantes ambientales [31].

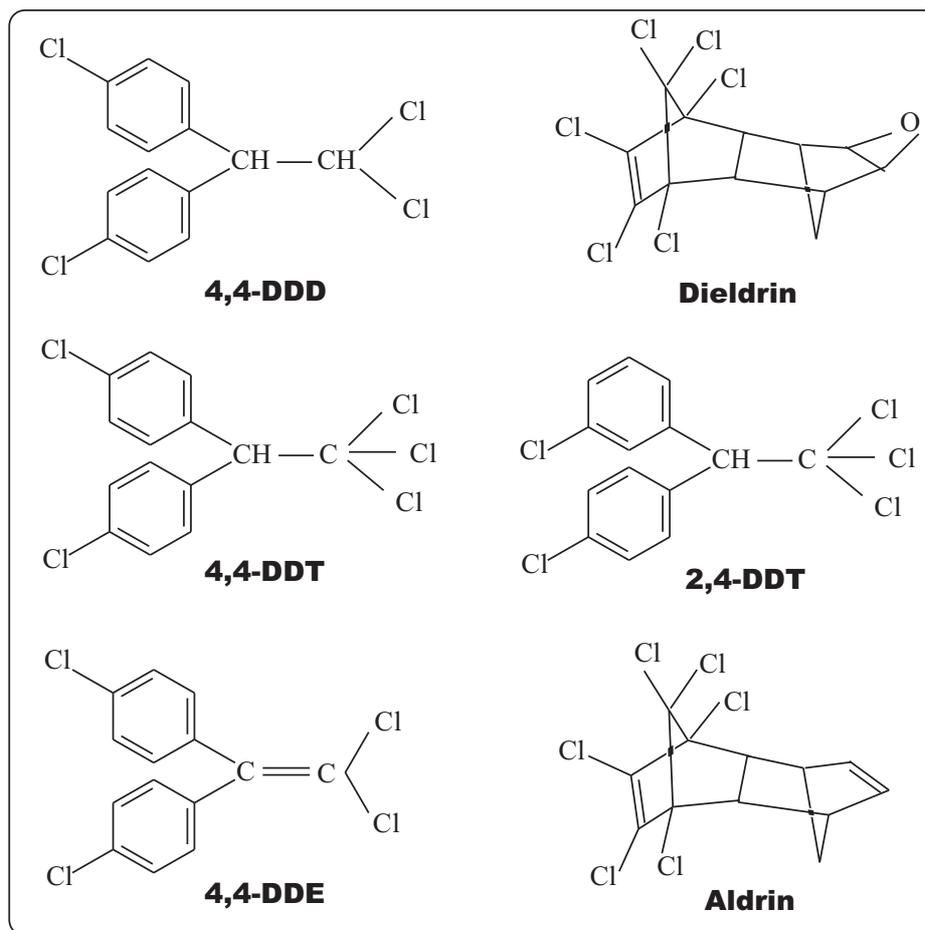


Figura 1.2: Fórmula química y estructura de los pesticidas estudiados

Propiedades como la presión de vapor, la dimensión y densidad de las partículas, son variables importantes para predecir el transporte atmosférico de las sustancias químicas [32]. La adsorción de una sustancia química en las partículas del suelo puede aumentar la probabilidad de que dicha sustancia sea transportada por el aire o por el agua y así podría depositarse en lugares remotos de su sitio de aplicación; o bien, puede retardar el movimiento de la misma a través de las aguas subterráneas, reduciendo la probabilidad de contaminación de las fuentes de

agua subterránea cerca del lugar de aplicación [33]. En la Tabla 1.2 se relacionan algunas propiedades físicas y químicas de los pesticidas estudiados [34, 35, 36].

Compuesto	Masa Molecular	Densidad (g/cm ³)	Pto.Ebull (°C)	Pto.Fusión (°C)
4,4'-DDD	320.04	1.38	350	110
Dieldrin	380.91	1.75	330	177
4,4'-DDT	354.49	0.99	260	109
2,4'-DDT	354.54	0.98	409	74
4,4'-DDE	318.03	1.40	336	89
Aldrin	364.91	1.6	145	105

Tabla 1.2: Propiedades físico-químicas de los pesticidas estudiados

Debido a que son solubles en grasa, estos compuestos químicos se encuentran en mayores concentraciones en los alimentos con un alto contenido en material graso [37]. El consumo de alimentos con grasas que pueden estar contaminadas con pesticidas organoclorados (p.e. leche y productos lácteos contaminados, pescado y ballenas) causa una mayor exposición a estos compuestos químicos [38]. Los niños se pueden ver expuestos mediante el consumo de leche materna y por medio de la placenta en el útero [39, 40].

El número de personas que mueren por pesticidas es bajo, pero decenas de miles de personas se envenenan con ellos todos los años padeciendo síntomas más o menos graves [31]. La mayoría son agricultores u otras personas que trabajan en contacto con los pesticidas [41, 42]. Sobre todo personas poco entrenadas para su uso, en los países en vías de desarrollo, son las que sufren estos percances.

Se calcula que el consumo de alimentos contaminados con DDT en los países desarrollados ha disminuido desde la década de 1950, sin embargo, los alimentos importados desde otros países que todavía utilizan DDT pueden estar contaminados [43]. Uno de los metabolitos más importantes del DDT es el 1,1'-(2,2-dicloro-etilo)-bis[4-clorobenceno] (DDE), que puede producirse en las personas o en el medio ambiente. El DDE permanece por más tiempo en el medio ambiente y en las personas que el DDT [26]. La presencia del DDT en el cuerpo refleja tanto una exposición relativamente reciente al compuesto químico como una exposición acumulada ocurrida en el pasado. Una proporción en la que hay una mayor concentración de DDT frente a una concentración menor de DDE puede indicar una exposición reciente [44, 45].

Como en el mundo actual todos estamos expuestos diariamente al contacto y a la ingestión de pequeñísimas cantidades de plaguicidas y otros productos artificiales, algunos autores sugieren que las consecuencias para la humanidad, a largo plazo, pueden ser serias. Hablan de disminución de la fertilidad, aumento en el número de cánceres, malformaciones congénitas, etc. Aunque no hay evidencia de que esto sea así, tampoco hay completa seguridad de que el efecto a largo plazo de todo este conjunto de sustancias que estamos poniendo en el ambiente sea totalmente inocuo [24]. La Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) y la Administración de Salud y Seguridad Ocupacionales (OSHA) han establecido una serie de criterios para determinar cuáles son los niveles permitidos de esos compuestos químicos en los alimentos, en el medio ambiente y en el lugar de trabajo [8].

Surfactantes

A lo largo de los últimos años se ha desarrollado un gran número de técnicas de análisis que se han aplicado a la determinación de pesticidas en una amplísima cantidad y variedad de muestras [46, 47]. A menudo, dichas técnicas no persiguen sólo evitar la manipulación excesiva de las muestras con procedimientos cada vez más rápidos y sencillos, sino que a su vez, se pretende determinar el mayor número de sustancias posibles en un solo análisis, por lo que es frecuente hablar de técnicas de análisis multiresiduo [38, 48].

Como paso previo a las técnicas cromatográficas, se utilizan técnicas de extracción de dichas sustancias, que varían fundamentalmente en función del tipo de matriz a analizar. Así para matrices líquidas se emplean metodologías de extracción líquido-líquido (LLE) [46], extracción en fase sólida (SPE) [49], microextracción en fase sólida (SPME) [50], etc. Mientras que para la extracción en matrices sólidas se hace uso de metodologías como Soxhlet [51], sonicación [52], extracción por fluidos supercríticos [53] o extracción asistida por microondas [54]. A su vez se puede realizar el acoplamiento de las técnicas SPE o SPME como paso posterior,

de clean-up o lavado, a las técnicas de extracción para matrices sólidas [55], p.e. el acoplamiento MAE-SPE [56, 57] o MAE-SPME [58, 59].

En las distintas técnicas de extracción anteriormente mencionadas destaca un aspecto común en todas ellas: la utilización de disolventes orgánicos como extractantes. El principal problema que conlleva la utilización de dichos disolventes es su toxicidad. Éstos son perjudiciales tanto para los investigadores que trabajan con ellos como para el medio ambiente. Por ello, se han de buscar y desarrollar nuevas metodologías de extracción que sean menos perjudiciales al ambiente y atmósfera de trabajo. En este sentido, en el presente trabajo se desarrolla la aplicación de los surfactantes como extractantes para evitar la utilización de disolventes orgánicos, en el análisis de pesticidas organoclorados en distintos tipos de matrices.

Los surfactantes, también conocidos como detergentes o tensioactivos son sustancias cuya principal característica es presentar una estructura anfipática; es decir, la presencia en una misma molécula de dos o más grupos con propiedades antagónicas respecto a su solubilidad en un determinado disolvente [60]. De manera que un monómero de surfactante o tensioactivo tiene una estructura R-X en la que R, es una cadena hidrocarbonada de 8 a 18 átomos de carbono denominada ‘cola’, de carácter hidrofóbico, y X es un grupo polar, de naturaleza iónica o no iónica, denominada ‘cabeza’.

Esta estructura “anfipática” de las moléculas de surfactante le confiere unas propiedades muy especiales al mismo. Entre ellas, la posibilidad de reducir la tensión superficial del agua y la de adsorberse en las superficies e interfases de un sistema formado por fases inmiscibles, fenómeno responsable de la mayoría de

las aplicaciones industriales de los surfactantes como detergentes, estabilizadores emulsionantes y de la formación de micelas.

Cuando el surfactante se disuelve en agua, la presencia del grupo hidrofílico impide que el surfactante sea expulsado completamente del disolvente; la estructura “anfipática” del surfactante causa no sólo la concentración del mismo en la superficie, sino también la orientación de la molécula con su grupo hidrofílico en la fase acuosa y su grupo hidrofóbico hacia el exterior [61].

Dependiendo de la naturaleza del grupo polar, los surfactantes se clasifican en cuatro grupos principales [62]:

- Catiónicos: el grupo hidrofílico posee carga positiva, como por ejemplo, las sales de amonio cuaternarias.
- Aniónicos: el grupo hidrofílico tiene carga negativa. Ejemplos de este tipo de surfactantes son las sales de ácidos alquil carboxílicos o sulfónicos.
- Zwitteriónicos: en el surfactante existen grupos con carga positiva y negativa. Los aminoácidos son un ejemplo de este tipo de surfactantes.
- No iónicos: el surfactante no posee grupos con carga, como por ejemplo, los monoglicéridos.

En disoluciones muy diluidas, los surfactantes suelen encontrarse como monómeros, dímeros, etc. Pero si la concentración de la disolución aumenta se produce un proceso de agregación que da lugar a cambios en las propiedades físicoquímicas de la disolución. El agregado coloidal que se forma recibe el nombre de “micela”. El número de moléculas de surfactante que pueden formar la micela se denomina número de agregación (N) y se halla en un rango de 50 a 100 [62, 63].

Hay una concentración, característica para cada surfactante, a partir de la cual se forma la micela. A esta concentración se le denomina concentración micelar crítica (CMC). Puede considerarse que la formación de micelas es un mecanismo alternativo a la adsorción en las interfases para evitar el contacto entre los grupos hidrofóbicos y el agua, y así disminuir la energía libre del sistema [61].

Las moléculas de surfactante no se asocian por enlaces covalentes sino por interacciones más débiles (Van der Waals, puentes de hidrógeno y electrostáticas). Por ello, la entalpía de formación de estos agregados es pequeña y, por tanto, se puede controlar la forma y el tamaño de dichos agregados en función de parámetros tales como la concentración de surfactante, la temperatura, el pH, la concentración de electrólito y la presión [64].

2.1. Aplicaciones de los medios micelares

Una de las propiedades más importantes de los surfactantes, relacionada con su capacidad para formar micelas, es la solubilización de solutos, lo que permite solubilizar, concentrar y compartimentalizar iones y moléculas, modificar equilibrios ácido-base y redox, influir en la velocidad de reacción, las rutas químicas y modificar la estereoquímica, así como las propiedades luminiscentes de algunos compuestos [65].

Las micelas, al presentar una microestructura con dominios hidrófilos y lipófilos diferenciados, tienen la capacidad para solubilizar moléculas tanto polares como no polares. En la Figura 2.1 se muestra la localización del solubilizado en un agregado micelar en función de su naturaleza polar, semipolar o apolar.



Figura 2.1: Esquema de localización de los analitos en el agregado micelar según su naturaleza

Como se aprecia en la figura, la solubilización se localiza en diferentes puntos en función de la naturaleza de la especie solubilizada pero también del surfactante.

Esta capacidad de solubilización hace que los agregados micelares posean importantes aplicaciones en campos como el químico, farmacéutico, fitosanitario y cosmético [66], donde los productos activos que se utilizan son generalmente poco solubles en agua o tienen que coexistir en una misma formulación componentes con polaridades distintas. Ya que, en general, la aplicación o administración de un principio activo no es efectiva si no se disuelve previamente.

Por otro lado, las propiedades dinámicas de las microemulsiones son muy importantes para el entendimiento de la conductividad, reacciones químicas y transferencia de masa en las microemulsiones. Esta dinámica de intercambio tan rápida es precisamente lo que favorece su utilización en sistemas de separación cromatográficos. De hecho, estos sistemas moleculares organizados son compatibles con HPLC – como fase móvil (cromatografía micelar) o como parte del extracto a analizar –. Además, la utilización de sistemas micelares supone grandes ventajas medioambientales, al permitir sustituir medios de reacción o extracción basados en disolventes orgánicos por otros medios coloidales, mayoritariamente acuosos, utilizando surfactantes biodegradables.

Los surfactantes no iónicos del tipo polioxi-etilén alquil éteres fueron sintetizados por primera vez a principios de los años 30. Desde entonces, su detergencia, sus propiedades humectantes y esponjantes y los usos generales como surfactantes no iónicos, los han hecho ampliamente utilizados en la industria y como productos domésticos.

En la Figura 2.2 se representan los diferentes tipos de surfactantes no iónicos utilizados en este estudio así como su estructura.

Su fórmula general es $C_nH_{2n+1}(OCH_2CH_2)_mOH$. Son conocidos como C_nE_m , donde n indica el número de átomos de carbono en la cadena alquílica y m representa el número de unidades de óxido de etileno en la parte hidrofílica.

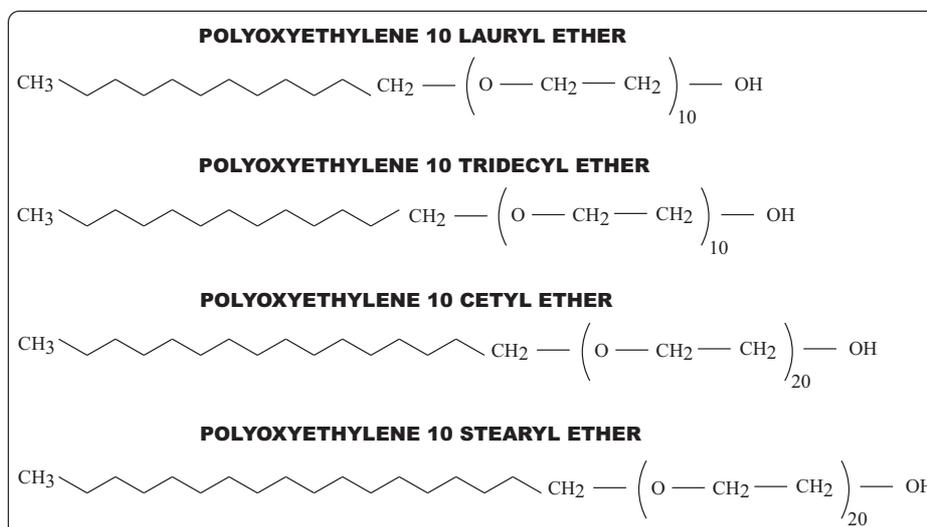


Figura 2.2: Estructura química de los surfactantes estudiados

Las micelas no son sistemas estáticos sino que están, junto con los solutos que han sido solubilizados por ellas, en equilibrio dinámico con el medio que las rodea. Las moléculas de surfactante entran y salen de la micela en microsegundos.

Se ha destacado la importancia de los medios micelares en separaciones analíticas debido a la capacidad que poseen las micelas para interactuar selectivamente con la moléculas, destacando su importancia en tres campos: procesos de extracción, cromatografía y separaciones electrocinéticas.

Sin embargo, también hay que mencionar su intervención en otros procesos como pueden ser el desplazamiento de equilibrios, la modificación de cinéticas de reacción, aumento de fluorescencia y fosforescencia [67, 68].

Técnicas de Extracción

3.1. Extracción por Microondas

Los métodos tradicionales para la extracción de compuestos orgánicos contaminantes de muestras sólidas han sido el Soxhlet, desarrollado por F. Soxhlet en 1879, y el baño de ultrasonidos o sonicación [69]. Estos métodos emplean grandes cantidades de disolventes orgánicos bajo condiciones de temperatura y agitación muy agresivas.

El Soxhlet es particularmente útil porque muchos contaminantes suelen estar muy fuertemente adsorbidos en las matrices sólidas (sedimentos, tierras, tejidos de organismos y plantas, etc.) pero requiere tiempos de extracción demasiado largos y el uso de disolventes orgánicos en grandes cantidades [51, 53]. Este hecho aumenta la toxicidad y encarece el proceso. Como consecuencia de las condiciones utilizadas para la extracción, puede producirse, además, la degradación de los analitos y pérdidas por volatilización de los mismos.

La extracción por sonicación es más rápida que la extracción por Soxhlet y permite la extracción desde grandes cantidades de muestras, pero también en esta técnica se utilizan grandes volúmenes de disolventes orgánicos [70, 71].

En la última década se ha producido una demanda creciente de nuevas técnicas de extracción susceptibles de ser automatizadas, con tiempos de extracción más cortos y un consumo reducido de disolventes orgánicos, a fin de prevenir problemas de toxicidad en los laboratorios y reducir los costes de preparación de muestras. De esta forma, han surgido nuevas técnicas como la extracción con fluidos supercríticos, SFE [69], la extracción acelerada, ASE [72], la microextracción en fase sólida, SPME [73] y la extracción asistida por microondas, MAE [54].

La extracción asistida por microondas (MAE) ha tenido un gran desarrollo en los últimos años debido a que permite la rápida extracción de los analitos de las matrices sólidas con una eficiencia en la extracción comparable a la que presentan los métodos clásicos [74]. Además, ofrece claras ventajas sobre éstos, ya que reduce considerablemente el tiempo de extracción, (de 20 a 30 minutos por muestra) y lo que es más importante, el consumo de disolventes orgánicos [75]. Al mismo tiempo presenta la posibilidad de realizar la extracción de varias muestras simultáneamente [76, 77].

Con respecto a las técnicas convencionales, MAE presenta una gran reducción del tiempo de análisis y de consumo de disolvente, así como la posibilidad de realizar extracciones simultáneas con reproducibilidades aceptables (ver Tabla 3.1).

	Extracción Soxhlet	Sonicación	SFE	MAE
TIEMPO DE EXTRACCIÓN	De 24 a a 48 horas	De 30 a 60 min	De 30 a 60 min	De 20 a 30 min
EXTRACTANTE	Disolventes orgánicos	Disolventes orgánicos	Disolventes supercríticos	Disolventes orgánicos
COSTO	Bajo	Bajo	Alto	Moderado
DESVENTAJAS	Grandes cantidades de disolventes y es necesario evaporar	Grandes cantidades de disolventes y es necesario evaporar	Dependencia del tipo de matriz y analito	Se requiere evaporación y filtración

Tabla 3.1: Características de las principales técnicas de extracción

Otra ventaja adicional de la MAE sobre las otras nuevas técnicas de extracción, como son la SFE o la técnica ASE, es que es una técnica de menor coste instrumental y más fácil de optimizar [69].

Actualmente, este tipo de extracción es una técnica consolidada, fundamentalmente para la extracción de compuestos orgánicos en matrices sólidas. Numerosas aplicaciones de la extracción asistida por microondas han sido publicadas para diferentes compuestos orgánicos en diversas matrices, con especial énfasis en aplicaciones medioambientales [78, 79].

La extracción asistida por microondas (MAE) consiste en calentar el extractante (generalmente en un disolvente orgánico) en contacto con la muestra mediante

la energía de las microondas. La partición de los analitos de interés de la muestra al extractante depende de la temperatura y de la naturaleza del extractante.

Cuando se utiliza la energía de microondas, al contrario de lo que ocurre en los procesos clásicos de calentamiento, toda la muestra se calienta simultáneamente, sin que se produzca el calentamiento del recipiente. Esto hace que se alcance el punto de ebullición del disolvente más rápidamente, y conduce a tiempos de extracción más cortos. En recipientes cerrados, el disolvente puede ser calentado por encima de su punto de ebullición, lo cual aumenta su velocidad y la eficacia de la extracción.

La aplicación de la energía de las microondas para la extracción de compuestos de una muestra puede llevarse a cabo mediante dos técnicas diferentes: con vasos cerrados (controlando la presión y la temperatura) y con vasos abiertos (a presión atmosférica).

En los sistemas de vasos cerrados, el extractante puede ser calentado por encima de su punto de ebullición a presión atmosférica. Así se consigue aumentar la velocidad y la eficiencia de la extracción. Estos sistemas permiten el control de la temperatura en el proceso de extracción. Además, se puede realizar la extracción simultánea de varias muestras en un solo proceso, reduciendo el tiempo total de extracción. Todos los vasos de las muestras son colocados en un carrusel en el interior de la cavidad del horno microondas, y giran 360° durante el proceso. La principal desventaja en los sistemas de vasos cerrados es que un aumento muy rápido de la temperatura en el interior de los vasos puede provocar la pérdida de los compuestos más volátiles. Por ello, después de realizar la extracción, los vasos

se deben enfriar a temperatura ambiente antes de abrirlos para evitar la pérdida de este tipo de compuestos.

En los sistemas de vasos abiertos, el proceso se realiza a presión atmosférica por lo que la temperatura máxima a la que se puede realizar la extracción viene dada por el punto de ebullición del extractante a esa presión. En estos sistemas la extracción de diferentes muestras hay que llevarla a cabo de manera secuencial, además, el tiempo de operación requerido para obtener resultados similares a los que se obtienen con vasos cerrados es mayor.

La optimización de la extracción asistida por microondas implica el estudio de los parámetros que tienen influencia en la extracción. Muchos investigadores han utilizado diseños factoriales, de composición central u ortogonal, para determinar las condiciones óptimas [80]. Entre los parámetros más estudiados se encuentran la composición y la naturaleza de los extractantes, así como el volumen del mismo; el tiempo y la temperatura de extracción; las características de la matriz y el grado de humedad de la misma.

Naturaleza de los extractantes

La elección del extractante es fundamental para conseguir una extracción óptima, puesto que la naturaleza del mismo es uno de los factores que influyen en la eficacia del proceso.

Para la selección del disolvente, tenemos que tomar en consideración algunas de las propiedades del mismo, como son su capacidad para absorber la radiación de microondas, sus interacciones con la matriz, así como su capacidad para solubilizar

el analito [81, 82]. Otro importante aspecto es la compatibilidad del disolvente utilizado para la extracción con el método analítico usado como paso final en la determinación.

Es común utilizar como disolventes en la extracción por microondas los mismos que se utilizan en los métodos convencionales de extracción. Sin embargo, no siempre son los más adecuados. Es posible combinar disolventes para mejorar la eficiencia del proceso. Se ha encontrado que pequeñas variaciones en la composición del disolvente producen una mejora en la eficacia de la extracción.

Volumen de Extractante

En algunos casos el volumen del disolvente puede ser un parámetro importante para mejorar la eficacia de la extracción. Dicho volumen debe ser suficiente como para que toda la muestra se encuentre inmersa en el mismo. La cantidad de disolvente necesaria para la extracción está comprendida, generalmente, entre 10 y 30 mL [83]. La proporción entre la cantidad de muestra y de disolvente no debería exceder de un 30-34 % (m/v).

Temperatura

La temperatura, probablemente el parámetro más estudiado, es un factor fundamental en el proceso de extracción por microondas [83]. Valores elevados de la misma generalmente aumentan la eficiencia de la extracción, bien como resultado de un aumento de la difusión del disolvente en el interior de la matriz, bien debido a la desorción de los analitos de los sitios activos de la misma.

Cuando la extracción por microondas es llevada a cabo en sistemas cerrados, la temperatura puede superar la temperatura de ebullición del disolvente, lo que

produce una mejora en la eficacia de la extracción. Además, al aumentar la temperatura, el disolvente tiene mayor capacidad para solubilizar los analitos, la tensión superficial y la viscosidad del disolvente disminuyen, lo que mejora la penetración del mismo en la matriz de la muestra.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que, a temperaturas elevadas, también pueden ser extraídas sustancias no deseadas, por lo que se pierde selectividad en la extracción. Además, hay que considerar la posible degradación de los analitos a altas temperaturas.

La temperatura óptima de la extracción depende también del tipo de matriz. Esto se comprobó en la extracción de pesticidas en diferentes tipos de cultivos: mientras que 100°C era una temperatura óptima para lechugas, para tomates era necesario elevar la temperatura hasta 120°C [84].

Potencia

Por lo general, la potencia es el parámetro a optimizar en la mayor parte de los microondas, pero en los sistemas cerrados la presión es también una variable importante, que es función de la potencia y la temperatura que se alcanza en el interior de los vasos.

La potencia elegida, en los sistemas de vasos cerrados, depende del número de vasos utilizados durante el proceso. Hay que tener en cuenta que algunos sistemas permiten realizar la extracción de varias muestras simultáneamente (6, 12 ó 24 muestras). Para evitar la posible degradación de algunos compuestos y una presión elevada en el interior de los vasos, esta potencia debe ser elegida cuidadosamente. La influencia de la potencia en la extracción está relacionada con el tiempo de extracción por microondas.

Tiempo de Extracción

Como en otras técnicas de extracción, el tiempo es otro parámetro que influye en la misma y que necesita ser considerado. En MAE, los tiempos de extracción son mucho más cortos que los necesarios en las técnicas convencionales. A menudo 5 ó 10 minutos son suficientes, como se ha demostrado para la extracción de contaminantes orgánicos [75].

Naturaleza de la Matriz

La naturaleza de la matriz en la que se encuentran enlazados los analitos de interés tiene una profunda influencia sobre la extracción de los mismos. Las diferentes interacciones que los contaminantes orgánicos presentan con los componentes orgánicos e inorgánicos de la matriz pueden jugar un papel importante en su solubilidad y en la difusión de los mismos en el disolvente.

El contenido en materia orgánica inhibe la extracción debido a la fuerte interacción que se establece entre el analito y la matriz, lo que dificulta su ruptura. Por esta misma razón, bajo las mismas condiciones, resulta mas fácil la extracción de los contaminantes en muestras enriquecidas que la de los contaminantes nativos de las mismas.

Esto puede ser explicado teniendo en cuenta el tiempo que el analito ha estado en contacto con la muestra, y si éste es incorporado solo por adsorción superficial, donde la formación de enlaces de hidrógeno y las interacciones por fuerzas de Van der Waals son los procesos predominantes; o está fuertemente ligado a la materia orgánica de la matriz de la muestra debido a mecanismos de transporte por difusión. En un estudio realizado por López Ávila et al. [85] sobre muestras

enriquecidas, los porcentajes de recuperación de algunos pesticidas organoclorados disminuían desde un 80-120 % hasta un 50-60 % después de 24 horas.

En la mayoría de los casos, se obtienen mayores recuperaciones para muestras enriquecidas que para los contaminantes nativos, demostrando el efecto de la fuerte interacción de la matriz con estos contaminantes nativos en función del tiempo de contacto. Este hecho explica la disminución de la recuperación en la extracción en muestras envejecidas.

3.1.1. Aplicaciones de la extracción asistida por microondas

Las aplicaciones de MAE se centran principalmente en la extracción de compuestos orgánicos en matrices sólidas. Aunque las primeras aplicaciones estuvieron relacionadas con la determinación de PAHs y PCBs en suelos y sedimentos, desde entonces, otros compuestos tales como pesticidas, fenoles y compuestos organometálicos han sido extraídos eficazmente [86, 87].

3.1.2. Extracción asistida por microondas utilizando surfactantes

Una nueva posibilidad de aplicación de MAE es el uso de surfactantes como extractantes, es decir, la extracción asistida por microondas con utilización de medios micelares, MAME [88, 89].

Los medios micelares pueden ser aplicados para la solubilización, extracción y preconcentración de distintos compuestos presentes en diferentes muestras medioambientales, tales como suelos y sedimentos, con los beneficios que aporta la utilización de los mismos; como son bajo coste, fácil manipulación y reducción de los efectos tóxicos respecto al uso de disolventes orgánicos [90, 91].

Los surfactantes no iónicos pueden ser efectivos en la solubilización y extracción de compuestos orgánicos desde matrices sólidas. Además, la disolución de surfactante es compatible con las fases móviles hidroorgánicas usualmente empleadas en cromatografía líquida de alta resolución, que suele utilizarse como técnica final de análisis.

En la Figura 3.1 se representa esquemáticamente el proceso de extracción por microondas utilizando surfactantes.

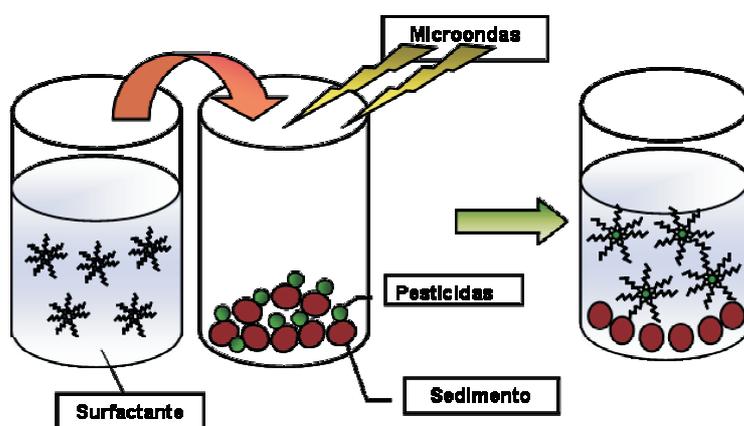


Figura 3.1: Representación del proceso de extracción por microondas con utilización de surfactantes

3.2. Microextracción en Fase Sólida (SPME)

La Microextracción en Fase Sólida (SPME) es una técnica que se basa en la extracción de analitos de la muestra mediante una fibra de sílice fundida que está recubierta de un sorbente, en la mayoría de los casos polimérico, seguida de la desorción de los analitos mediante temperatura o un disolvente orgánico [73]. El pequeño tamaño de la fibra y su geometría cilíndrica permiten incorporarla en una jeringa. De esta forma, se facilita su manipulación y al mismo tiempo se protege la fibra cuando no se utiliza, ya que ésta permanece dentro de la aguja de la jeringa.

Esta técnica presenta una serie de ventajas frente a otras técnicas de preconcentración, ya que es muy simple, presenta un bajo coste, puede ser automatizada y requiere pequeños volúmenes de muestra [73, 92]. Además, debido a su diseño, es fácilmente transportable por lo que la hace una técnica muy adecuada para realizar análisis de campo. Otra ventaja que presenta es la posibilidad de utilizarse con todos los tipos de muestras, ya sean gaseosas, líquidas como en agua [93] o bebidas [94, 95, 96], o sólidas como suelos [97, 98], sedimentos [99] y alimentos [100]. Como inconveniente se puede mencionar que debido a la limitada capacidad de las fibras (la cantidad de recubrimiento es muy pequeña) en ocasiones no se obtienen unos límites de detección tan bajos a los esperados, sobre todo si la SPME se utiliza combinada con la cromatografía de líquidos [101].

3.2.1. Fundamentos teóricos de SPME

El principio en el que se basa la SPME es la partición de los analitos entre la matriz de la muestra y el recubrimiento de fibra [102]. Así, el transporte de los

analitos comienza cuando la fibra entra en contacto con la muestra y la extracción se considera completa cuando la concentración de analito ha alcanzado el equilibrio de distribución entre la muestra y la fibra [103].

Existen básicamente dos modos de extracción posibles en SPME, introduciendo la fibra directamente en la muestra o bien en el espacio de cabeza o 'headspace'. El modelo matemático que explica la dinámica del proceso de absorción cuando la fibra se introduce directamente en la muestra fue desarrollado por Louch et al. [104] y en él se confirma la relación lineal que existe entre la cantidad de analito absorbida por la fibra en el estado de equilibrio y la concentración de éste en la muestra. Esta afirmación se muestra reflejada en la siguiente ecuación:

$$n = \frac{K_f s V_f C_0 V_s}{K_f s V_f + V_s} \quad (3.1)$$

donde n son los moles de analito absorbidos por la fibra, V_f y V_s son los volúmenes de fibra y de muestra respectivamente, $K_f s$ es el coeficiente de partición del analito entre la fibra y la muestra y C_0 es la concentración inicial de analito en la muestra. En la ecuación 3.1 se asume que la matriz de la muestra es una única fase homogénea y no se considera el efecto del espacio de cabeza.

El modelo matemático del proceso de SPME cuando los analitos se extraen del espacio de cabeza fue desarrollado posteriormente y las ecuaciones y conclusiones a las que se llega son similares a las de la extracción por inmersión pero teniendo en cuenta una tercera fase gaseosa [102].

En las condiciones de trabajo de la SPME, generalmente se cumple que $V_s \gg K_f s V_f$ ya que en la mayoría de los casos V_f es mucho más pequeño que V_s por lo que la ecuación 3.1 se transforma en la siguiente:

$$n = K_f s V_f C_0 \quad (3.2)$$

En la ecuación 3.2 se puede observar que la cantidad de analito extraída (n) es directamente proporcional a la concentración de analito en la muestra e independiente del volumen de muestra. Esta aproximación no es válida en el caso en que los analitos a determinar tengan valores de $K_f s$ muy elevados (gran afinidad por la fibra) y se estén utilizando volúmenes de muestra muy pequeños.

Otro factor que se debe tener en cuenta, es el hecho de que no en todos los tipos de fibras existentes actualmente, la extracción de los analitos se realiza mediante un proceso de absorción, que es lo que se considera en este modelo matemático. Así, existen fibras, que se mencionarán posteriormente, en las que la extracción de los analitos se produce mediante un proceso de adsorción por lo que en estos casos el modelo matemático que explica el proceso de extracción es ligeramente diferente [73]. La ecuación que define el proceso de extracción por adsorción es la siguiente:

$$n = \frac{K_f s^D V_f C_0 V_s (C_f max - C_f)}{K_f s V_f + V_s (C_f max - C_f)} \quad (3.3)$$

donde $K_f s^D$ es el coeficiente de distribución del analito entre la muestra y la superficie de la fibra, C_f es la concentración final de analito en la superficie de la fibra y $C_f max$ es la concentración máxima de analito en la superficie de la fibra. Los demás parámetros son los mismos que los que aparecen en la ecuación 3.1.

En SPME también se debe tener en cuenta la cinética del proceso ya que los analitos deben ser transportados desde la matriz de la muestra a la fibra en inmersión o desde la matriz de la muestra al espacio de cabeza y de allí hacia la

fibra, en el caso de que la extracción se realice mediante extracción del espacio de cabeza de la muestra (HS-SPME). Para aumentar la velocidad de la extracción es necesario utilizar un sistema de agitación de manera que se facilite la difusión de los analitos hacia la superficie de la fibra. Esto no es necesario con muestras gaseosas ya que la propia convección del aire es suficiente para llegar al equilibrio de forma rápida. En muestras líquidas, sin embargo, se han utilizado diferentes modos de agitación como por ejemplo barras magnéticas agitadoras, ultrasonidos o movimientos de la fibra o del vial. Estos sistemas de agitación sirven para disminuir el efecto causado por la zona estática que se forma alrededor de la fibra y que disminuye la velocidad de extracción, así como para compensar los bajos coeficientes de difusión de las matrices líquidas [102].

Como se puede observar en las ecuaciones 3.1, 3.2 y 3.3, la eficacia de la extracción depende del coeficiente de partición, K_{fs} , o de distribución, K_{fs}^D , que es un parámetro característico de cada pareja analito-fibra y describe las propiedades del recubrimiento de la fibra y su afinidad para cada analito.

3.2.2. Procedimiento de SPME

En el proceso de SPME se pueden diferenciar principalmente dos etapas. Una primera etapa de extracción, en la que la fibra recubierta del sorbente se pone en contacto con la muestra durante un tiempo y temperatura determinadas, de manera que se produce una migración de los analitos desde la solución a la fibra hasta que se alcanza la situación de equilibrio. Después de esta primera etapa, se realiza la desorción de los analitos retenidos por la fibra.

Existen dos formas básicas de realizar la extracción en SPME: extracción por inmersión directa o bien del espacio de cabeza.

El modo de extracción HS-SPME permite proteger la fibra de compuestos de elevado peso molecular u otras interferencias no volátiles [105]. Además permite modificar la matriz de la muestra, como por ejemplo variando el pH, sin dañar la fibra. Este modo de extracción es muy útil para el análisis de muestras sólidas como sedimentos o alimentos [99] o muestras biológicas [87, 106] donde la interferencia de la matriz es importante, pero está restringido a compuestos volátiles o semivolátiles.

En la Figura 3.2 se muestra una ilustración del proceso de SPME por inmersión.

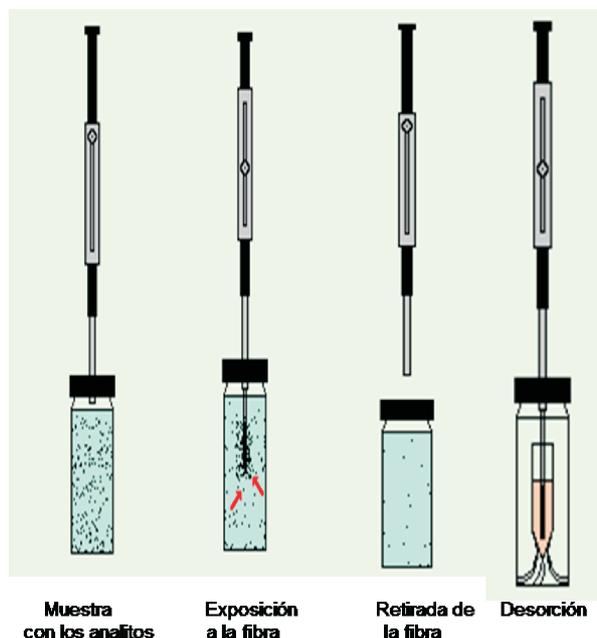


Figura 3.2: Esquema del proceso SPME por inmersión directa

En lo que respecta a la etapa de desorción, ésta se realiza térmicamente o bien por adición de un disolvente orgánico, dependiendo de la técnica analítica que se utilice a continuación. Así, si la SPME se acopla a la cromatografía de gases (GC), la desorción se realiza térmicamente [107, 108], y si ésta se combina con la HPLC,

se lleva a cabo mediante el uso de un disolvente orgánico [109, 110], pudiéndose utilizar una interfase SPME-HPLC [111, 112].

Tipos de fibras en SPME

Actualmente hay fibras con diferentes recubrimientos de manera que la SPME puede usarse para determinar distintos tipos de compuestos de forma específica [113]. Los primeros recubrimientos comercializados fueron los de polidimetilsiloxano (PDMS) y poliacrilato (PA) pero los tipos de recubrimientos han ido aumentando y actualmente cubren un amplio conjunto de aplicaciones [73, 114]. En la Tabla 3.2 se muestran las fibras comercializadas por Supelco.

Generalmente, la naturaleza del analito determina la fibra a utilizar en cada caso. En general, se utilizan recubrimientos polares como PA o Carbowax (CW) para analitos polares como fenoles y recubrimientos apolares como PDMS para analitos apolares como PAHs o BTEX (benceno, tolueno, xileno y etilbenceno) [115, 116].

La extracción de los analitos de la muestra mediante las fibras de PDMS se debe principalmente a un fenómeno de absorción [117]. Las fibras de PA, en cambio, son adecuadas para analitos polares y, aunque el recubrimiento es un polímero sólido, su baja densidad hace que los analitos sean absorbidos por la fibra al igual que en las fibras de PDMS. Las fibras en las que se combina más de un polímero, como por ejemplo las de PDMS/DVB o CW/DVB, son más adecuadas para la determinación de analitos volátiles ya que a diferencia de las fibras de PDMS y PA, la principal interacción entre la fibra y los analitos se produce por adsorción,

Fase estacionaria/espesor	Tª máxima de uso	Polaridad	Uso recomendado
<i>Polidimetilsiloxano (PDMS)</i> 100 µm, fase no enlazada 30 µm, fase no enlazada 7 µm, fase enlazada	280 °C 280 °C 340 °C	No polar No polar No polar	GC/HPLC GC/HPLC GC/HPLC
<i>Polidimetilsiloxano/Divinilbenceno (PDMS/DVB)</i> 65 µm, fase parcialmente entrecruzada 60 µm, fase parcialmente entrecruzada 65 µm, fase muy entrecruzada (stableflex ¹)	270 °C - 270 °C	Bipolar Bipolar Bipolar	GC HPLC GC
<i>Poliacrilato (PA)</i> 85 µm, fase parcialmente entrecruzada	320 °C	Polar	GC/HPLC
<i>Carboxen/Polidimetilsiloxano (CX/PDMS)</i> 75 µm, fase parcialmente entrecruzada 85 µm, fase muy entrecruzada (stableflex ¹)	320 °C 320 °C	Bipolar Bipolar	GC GC
<i>Carbowax/Divinilbenceno (CW/DVB)</i> 65 µm, fase parcialmente entrecruzada 70 µm, fase muy entrecruzada (stableflex ¹)	265 °C 265 °C	Polar Polar	GC GC
<i>Carbowax/Templated Resin (CW/TPR)</i> 50 µm, fase parcialmente entrecruzada	-	Polar	HPLC
<i>Divinilbenceno/Carboxen/Polidimetilsiloxano (DVB/CX/PDMS)</i> 50/30 µm, fase muy entrecruzada (stableflex ¹) 50/30 µm, fase muy entrecruzada (stableflex ¹) ²	270 °C 270 °C	Bipolar Bipolar	GC GC
¹ Fibras Stableflex: el recubrimiento está depositado sobre una fibra de sílice fundida flexible ² Longitud especial de 2 cm			

Tabla 3.2: Tipos de fibra comercializados para su uso en SPME

ya que son polímeros sólidos [102, 73]. En general, en estas fibras los coeficientes de distribución de los analitos son mayores que los que presentan las de PDMS.

En la Figura 3.3 se clasifican las fibras comerciales según si el proceso de extracción se produce mayoritariamente por absorción o adsorción.

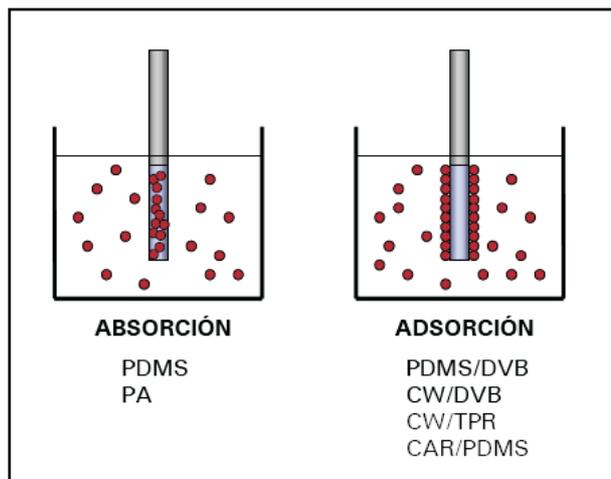


Figura 3.3: Clasificación de las fibras de SPME según si la extracción se produce por absorción o adsorción

Variables que afectan al proceso de SPME

El proceso de SPME se puede ver afectado por una serie de variables experimentales que pueden ser modificadas para incrementar la eficacia del proceso de extracción. Como se ha mencionado anteriormente, entre estas variables se encuentra la agitación de la muestra, que incrementa la difusión de los analitos desde la matriz de la muestra a la fibra, por lo que se disminuye el tiempo requerido para llegar al equilibrio.

Otros parámetros importantes son el tiempo y la temperatura de extracción, así como la modificación de las condiciones de la muestra, y los parámetros que afectan la etapa de desorción. Estos últimos dependen de la técnica analítica que se utilice a continuación para llevar a cabo la separación y cuantificación de los analitos.

Etapa de absorción/adsorción

Los parámetros que pueden afectar de alguna u otra forma en el proceso de absorción/adsorción son los siguientes: el tiempo y la temperatura de extracción, la agitación de la muestra, el volumen de muestra, así como las condiciones de la muestra (pH, adición de sales o disolventes orgánicos).

El tiempo de extracción en SPME es un parámetro muy importante a tener en cuenta. Al desarrollar un método analítico basado en SPME se debe determinar el tiempo necesario para llegar al estado de equilibrio, que es característico de cada analito-fibra e intentar trabajar en esas condiciones. El tiempo de equilibrio es aquel a partir del cual la cantidad de analito extraída se mantiene constante [102]. Sin embargo, para algunos compuestos el tiempo necesario para llegar a esta situación es muy elevado, por lo que generalmente se opta por trabajar en condiciones de no equilibrio y se seleccionan tiempos de extracción inferiores para no alargar el tiempo de análisis. En estos casos es muy importante controlar estrictamente el tiempo de extracción ya que pequeñas oscilaciones en la medida del tiempo pueden variar de forma considerable la cantidad de analito extraída.

La temperatura de extracción contribuye de dos formas completamente opuestas en el proceso de SPME [102]. Por un lado, los coeficientes de difusión de los analitos en la muestra aumentan al incrementar la temperatura, por lo que aumenta la cantidad de analito extraída. Por otro lado, un aumento de la temperatura disminuye los coeficientes de distribución del analito entre la muestra y la fibra por lo que la eficacia de la extracción se ve afectada negativamente. Por ello, hay que elegir la temperatura de extracción más adecuada para cada pareja matriz-fibra.

La concentración de sal en la muestra y la modificación del pH también pueden afectar al proceso de SPME. La presencia de sales, generalmente NaCl, aunque en algunos casos se han utilizado otras sales como Na_2SO_4 en la muestra, aumenta el coeficiente de distribución de los analitos que están presentes en forma no ionizada, por lo que la cantidad de analito extraída generalmente aumenta [102]. Sin embargo, si los analitos están en forma ionizada, se observa una disminución de la eficacia de la extracción. Esto se debe al aumento del coeficiente de actividad de las especies iónicas al aumentar la fuerza iónica de la solución. El pH de la muestra es otro factor a tener en cuenta en la optimización del proceso. Los analitos deben estar siempre presentes en la muestra en su forma neutra para su extracción.

El volumen de muestra es otro parámetro a tener en cuenta. Así, éste se debe seleccionar en función de los coeficientes de distribución de los analitos, K_{fs} . Éstos pueden estimarse a partir de datos bibliográficos o bien calcularse a partir de una serie de ecuaciones matemáticas.

Como puede observarse en la ecuación 3.1, al aumentar el volumen de la muestra, V_s , la cantidad de analito extraída, n , también aumenta, pero si V_s es significativamente más grande que el producto de K_{fs} y el volumen de la fibra, V_f , la cantidad de analito extraída es independiente del volumen de muestra (ver ecuación 3.2). En la práctica, teniendo en cuenta un 5 % de error se puede asumir que:

$$V_s = 20K_{fs}V_f \quad (3.4)$$

Esto implica que para compuestos con K_{fs} superiores a 200 y una fibra de 100 μm es suficiente un vial de 2 ml para conseguir la máxima sensibilidad, mien-

tras que viales de 40 ml pueden ser usados para compuestos con K_{fs} hasta 4000 [102]. En consecuencia, el uso de volúmenes de muestra mayores que el volumen limitante, no afectará a la sensibilidad del método pero si puede mejorar la precisión.

Aunque en general la presencia de disolventes orgánicos en muestras acuosas disminuye la cantidad de analito extraída, ya que aumenta la solubilidad de los analitos en la muestra, en algunas ocasiones el proceso de extracción puede verse favorecido debido a cambios en las interacciones entre la fibra y los analitos.

Etapa de desorción

Los parámetros que afectan a la etapa de desorción dependen del tipo de proceso utilizado (térmica o por disolvente orgánico). Si ésta se realiza térmicamente en un cromatógrafo de gases, los parámetros a optimizar son la temperatura y el tiempo de desorción [118, 119]. Cuando la desorción se realiza mediante el uso de un disolvente orgánico y fuera de línea con el cromatógrafo de líquidos [109, 112], los parámetros a optimizar son el tipo de disolvente orgánico (que debe ser compatible con la fibra y con la técnica analítica posterior) y el volumen de disolvente. En general, debe utilizarse el menor volumen de disolvente orgánico posible sin que se produzca efecto memoria, de forma que el factor de preconcentración sea mayor [120].

Cuando la desorción se realiza en la interfase de SPME para HPLC, ésta se puede llevar a cabo en modo estático y dinámico [109]. La forma mas sencilla de acoplar la SPME utilizando la interfase de SPME-HPLC es usar la fase móvil como disolvente de desorción, aunque en algunos casos se debe introducir algún disolvente organico en la interfase para ayudar a la desorción [115]. Así, en modo

dinámico los parámetros a optimizar son el flujo de la fase móvil y el disolvente de desorción, si es necesario. En modo estático, además, se debe optimizar el tiempo de desorción. Éste debe ser suficiente para desorber completamente los compuestos sin que se produzca efecto memoria, al igual que el tiempo de desorción en GC.

3.3. Extracción en fase sólida (SPE)

Es una técnica de preparación y tratamiento de muestras que está basada en la retención selectiva de analitos y posterior elución [46]. Se puede aplicar a cualquier tipo de técnica analítica [121, 122], siendo sus objetivos principales:

- *Enriquecimiento de trazas*: concentración o preconcentración. Puede realizarse una preconcentración de hasta tres órdenes de magnitud.
- *Limpieza de muestras*: para eliminar interferencias, utilizando los disolventes de lavado adecuados.
- *Fraccionamiento de la muestra*: en diferentes compuestos o grupos de compuestos, eluyendo cada fracción con una fase líquida distinta.
- *Almacenamiento de analitos*: que son inestables en un medio líquido o que tienen volatilidad elevada.
- *Reacciones de derivatización*: entre grupos reactivos del analito y los grupos de la superficie del adsorbente.

3.3.1. Fundamentos de la SPE

La extracción en fase sólida (SPE) es un proceso físico-químico en el que están implicadas una fase sólida y un líquido. La fase sólida tiene mayor atracción por

los analitos que el disolvente en el que se encuentran. Cuando la disolución de la muestra pasa a través del lecho del adsorbente, según las características del mismo, los analitos se concentran en su superficie, mientras que otros componentes de la muestra no retenidos pasan a través de él [123].

Se pueden conseguir extracciones muy selectivas eligiendo adecuadamente el adsorbente [47, 124].

3.3.2. Etapas de una extracción SPE

En la Figura 3.4 se indican las etapas a seguir para realizar una extracción en fase sólida [121].

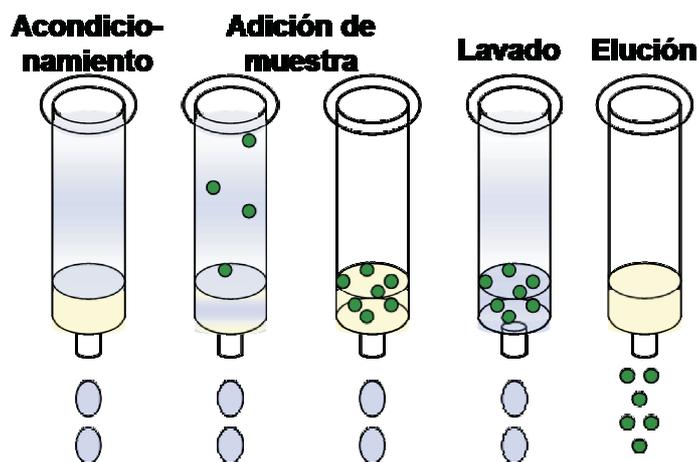


Figura 3.4: Etapas en la utilización de un procedimiento de SPE

- Etapa 1: Corresponde al acondicionamiento del cartucho para que esté solvatado. Prepara la fase sólida para que pueda interactuar mejor con la muestra.

- Etapa 2: La muestra pasa a través del adsorbente.
- Etapa 3: El adsorbente retiene selectivamente a los analitos y alguna interferencia, el resto de compuestos pasan sin ser retenidos.
- Etapa 4: El adsorbente se lava con un disolvente selectivo, adecuado para eluir las interferencias retenidas, mientras que los analitos permanecen en el lecho adsorbente.
- Etapa 5: Los analitos concentrados y purificados son eluidos del adsorbente con un disolvente adecuado.

Para hacer pasar los disolventes y la muestra a través de los cartuchos se ha de aplicar presión o vacío. Para facilitar el manejo y poder realizar extracciones simultáneas, los cartuchos se conectan a una estación de vacío. Estos sistemas llevan una válvula que permite regular la intensidad de vacío y obtener resultados más reproducibles.

3.3.3. Retención y Elución

Retención

Se produce porque existe una atracción entre el adsorbente y las moléculas del analito, quedando inmovilizado en la superficie del adsorbente cuando la disolución de la muestra pasa a través del lecho del adsorbente. En la retención influyen tres factores:

- La muestra
- La fase estacionaria
- El disolvente

Elución

Es el proceso en el que un analito es separado del lecho adsorbente en el cual ha sido retenido. Ocurre cuando se introduce un disolvente que interacciona más fuertemente con el analito que el adsorbente. Es importante distinguir entre elución de la matriz y elución de los analitos:

- *Elución de la matriz*: debe elegirse un disolvente que eluya a la matriz con más fuerza que la fase estacionaria. Es importante elegir la fase y el disolvente de elución de la matriz (lavado), de tal manera que los analitos no eluyan con este disolvente de lavado.
- *Elución de los analitos*: debe utilizarse la mínima cantidad de disolvente elegido para eluir los analitos.

Las condiciones de fuerte retención y rápida elución deben cumplirse en todo proceso de SPE.

3.3.4. Capacidad y Selectividad

Capacidad

Es la cantidad máxima de un analito que puede ser retenido por una masa determinada de adsorbente bajo condiciones óptimas.

Cuando se selecciona el tamaño de cartucho óptimo para una aplicación particular, los factores a considerar son:

- Capacidad para retener a todos los analitos de la muestra
- Volumen original de la muestra
- Volumen final de muestra purificada después de la elución

Cuando se calcula la cantidad de un determinado adsorbente requerido para un procedimiento de extracción, además de los analitos, también deben considerarse otros compuestos *no deseados* que pueden retenerse junto con los analitos.

Selectividad

Es la capacidad del adsorbente para discriminar entre los analitos y los restantes componentes de la matriz. Un adsorbente muy selectivo es aquel que retiene solamente a los analitos de la matriz de muestra.

La selectividad de un proceso de SPE es función de tres parámetros:

- La estructura química de los analitos
- Las propiedades del adsorbente
- La composición de la matriz de la muestra

Volumen de Rotura

Un parámetro práctico importante en SPE es el denominado ‘volumen de rotura’, que es el volumen de muestra a partir del cual el analito ya deja de ser retenido por el adsorbente, y por tanto, se ha excedido la capacidad del mismo. Este parámetro limita el volumen de muestra máximo que puede ser usado en SPE.

Flujo

Otro factor importante para optimizar un proceso de SPE es el flujo de la muestra y de los disolventes que pasan a través del lecho adsorbente. El flujo requerido es función de lo fuertemente que el analito esté retenido en la cantidad

de adsorbente. Generalmente el flujo no debe exceder de 5-10 ml/minuto a través de lechos de 100 mg de adsorbente. Este flujo es válido para todas las etapas del proceso de extracción, tanto para la aplicación de la muestra, como para los lavados intermedios y elución final de los analitos.

3.3.5. Tipos de fases

Las fases sólidas empleadas en SPE son similares a las empleadas en cromatografía líquida en columna. Las más utilizadas son: carbón activo, alúmina, sílica gel, silicato de magnesio (Florisil) [125, 126], sílices enlazadas y polímeros como estireno-divinilbenceno [123, 127].

Objetivos del Trabajo

La búsqueda de nuevos métodos de análisis, que permitan mejorar la sensibilidad, selectividad, rapidez y coste de los ya existentes, ha sido siempre el objetivo de todo nuevo proceso analítico. En la presente Tesis Doctoral se ha planteado, como objetivo general, el desarrollo de nuevos métodos de extracción y preconcentración de pesticidas organoclorados presentes en muestras medioambientales de diferente naturaleza, utilizando medios micelares como extractantes y su posterior determinación por cromatografía líquida de alta resolución.

Se ha elegido una mezcla de seis pesticidas organoclorados de interés prioritario para la EPA. Con dicha mezcla se ha realizado la optimización, validación y aplicación de los métodos de extracción y determinación desarrollados.

Los surfactantes utilizados fueron del tipo polioxietilen alquil éter:

- Polioxietilen 10 Lauril ether (POLE)
- Polioxietilen 10 Stearil ether

- Polioxietilen 10 Cetil ether
- Polioxietilen 10 Tridecil ether

Entre otras ventajas, respecto a los métodos convencionales, se pretende conseguir una reducción considerable en el tiempo de análisis de las muestras y la minimización en el consumo de disolventes orgánicos, gracias al uso de otros extractantes, los surfactantes, menos agresivos con el medioambiente y de menor coste.

En atención a lo expuesto se han planteado los siguientes objetivos parciales:

- Establecer las condiciones de separación adecuadas para la mezcla de pesticidas organoclorados estudiada, utilizando la cromatografía líquida de alta resolución con detector UV-visible.
- Caracterizar las propiedades físico-químicas de los suelos y fangos estudiados.
- Optimizar las condiciones para la extracción de pesticidas organoclorados en muestras de suelos, fangos, algas y moluscos mediante la extracción asistida por microondas, con medios micelares como extractantes. Se utilizarán diversos diseños factoriales para la optimización de la concentración, volumen de surfactante, así como las condiciones de irradiación del microondas, tiempo y potencia.
- Establecer la influencia de algunas de las características de la matriz, como el pH, el contenido en materia orgánica, la composición granulométrica y la conductividad, en el proceso de extracción de los pesticidas organoclorados en muestras de suelos y fangos.

-
- Aplicar la extracción asistida por microondas con medios micelares a distintos tipos de muestras, previamente enriquecidas con los pesticidas organoclorados, después de diferentes periodos de envejecimiento.
 - Optimizar las condiciones de la microextracción en fase sólida (SPME) como paso de limpieza y preconcentración tras la extracción micelar asistida por microondas (MAME) para distintos surfactantes.
 - Aplicar la extracción MAME-SPME a distintos tipos de muestras (suelos, fangos y algas), previamente enriquecidas con los pesticidas organoclorados.
 - Optimizar las condiciones para la extracción en fase sólida (SPE) como paso de limpieza y preconcentración tras la extracción micelar asistida por microondas (MAME).
 - Aplicar la extracción MAME-SPE a distintos tipos de muestras (algas y moluscos), previamente enriquecidas con los pesticidas organoclorados.

II

Experimental

Aparatos y Reactivos

5.1. Aparatos Utilizados

5.1.1. Cromatografo Líquido de Alta Resolución



Figura 5.1: Cromatografo

Para la determinación cromatográfica se utilizó un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) Varian con detector UV-visible (Varian Ibérica, S.L. Madrid, España).

Este sistema está compuesto por una bomba Varian 240 acoplada a un auto-muestreador Varian 410 con selector de volumen de inyección, un módulo Horno de Columna Varian (modelo 500) y un detector ultravioleta-visible de diodos, también de Varian. Las columnas utilizadas fueron: Varian Microsorb-MV C₁₈, 250x4.6 mm (con relleno de partículas de 8 μm) y Varian Microsorb-MV C₁₈,

150x4.6 mm (con relleno de partículas de 4 μm). El software utilizado para la obtención de los cromatogramas y su posterior tratamiento fue *Star* de Varian.

5.1.2. Microondas



Figura 5.2: Microondas

El equipo de extracción consistió en un sistema de digestión por microondas modelo Multiwave B30MC06A, de la marca Anton Paar (Graz, Austria). Este microondas permite el control de tiempo y potencia, así como medir la temperatura en cada vaso.

Está equipado con rotor 6EVAP, con una frecuencia de 2450 MHz a potencia total, con 6 vasos de PFA, modelo MF100, para un volumen máximo de 50 ml.

5.1.3. Extracción en fase sólida

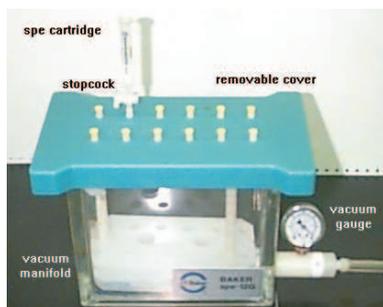


Figura 5.3: Estación SPE

La estación de vacío utilizada para hacer pasar los disolventes y la muestra a través de los cartuchos fue una Vac Elut 20 Manifold 16x100 mm (Varian, España). Permite realizar hasta 20 extracciones simultáneas.

5.1.4. Sistema Soxhlet

Para la validación de los métodos propuestos correspondientes a la extracción de pesticidas organoclorados en algas y moluscos, se empleó un sistema de extracción Soxhlet [75, 128] de la marca Pobel (Madrid, España) y capacidad 250 ml.

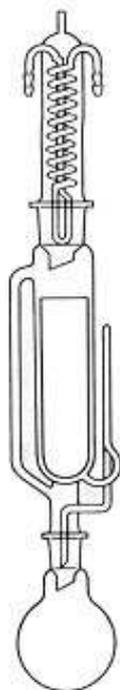


Figura 5.4: Soxhlet

En este procedimiento, la muestra sólida se coloca en un cartucho de material poroso que se sitúa en la cámara del extractor de Soxhlet. Se calienta el disolvente extractante, situado en el matraz, se condensan sus vapores que caen, gota a gota, sobre el cartucho que contiene la muestra, extrayendo los analitos solubles. Cuando el nivel del disolvente condensado en la cámara alcanza la parte superior del sifón lateral, el disolvente, con los analitos disueltos, asciende por el sifón y retorna al matraz de ebullición. Este procedimiento se repite hasta que se completa la extracción de los analitos de la muestra y se concentran en el disolvente.

5.1.5. Tratamiento Estadístico

El diseño experimental utilizado en este estudio se realizó usando el Software Statgraphics Plus, versión 5.1 (Manugistic, Rockville, MD, USA). Este programa permite obtener diseños experimentales de tipo factorial (2^3 : *en pantalla* y 3^2 : *superficie de respuesta*) de forma aleatoria para proteger los resultados de variables

ocultas, factores ambientales u otros no controlados, que pudiesen estar influyendo en el proceso de extracción.

Para el tratamiento estadístico de los datos se hizo uso del programa SPSS 11.0 (SPSS Inc., Illinois, USA), con el que se calcularon las correlaciones parciales y bivariadas entre las variables dependientes y la variable independiente (cantidad obtenida de los analitos de interés, dado en recuperaciones o áreas).

5.2. Reactivos y Disoluciones

5.2.1. Reactivos

Los pesticidas organoclorados utilizados en este trabajo, indicados en la Tabla 1.1 del apartado 1.2, son de la marca Cerrillant Corporation y fueron adquiridos en LGC Promochem (Barcelona, España). El metanol utilizado para preparar las disoluciones, así como la fase móvil, fue de la marca Panreac (Barcelona, España). El agua utilizada (agua Milli-Q), tanto para la preparación de las disoluciones de surfactante como para la preparación de fase móvil, se obtiene de un sistema de purificación de la marca Millipore (MA, EEUU). Los disolventes empleados para la fase móvil (metanol y agua) se filtraron a través de filtros de membrana de nylon de 0.22 μm ; los demás se utilizaron directamente sin ningún tratamiento.

El hexano utilizado para la extracción Soxhlet de calidad “análisis” fue suministrado por Merck (Barcelona, España).

Los surfactantes polioxietilénicos, polioxietilen 10 lauril éter, polioxietilen 10 stearyl éter, polioxietilen 10 cetil éter y polioxietilen 10 tridecil éter, son de la marca Sigma (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

La fuerza iónica de las disoluciones en SPME se modificó añadiendo cloruro sódico (NaCl) de la marca Panreac (Barcelona, España).

Para la determinación del contenido en materia orgánica de los suelos se utilizó ácido sulfúrico del 96 % riqueza, dicromato potásico y sal de Mohr (sulfato de amonio de hierro II hexahidratado), de calidad “pro-análisis” de la marca Panreac.

Muestras certificadas

La muestra de suelo certificada conteniendo pesticidas organoclorados (CRM-804-050), de la marca Resource Technology Corporation fue suministrada por LGC Promochem (Barcelona, España). La concentración de los pesticidas fue certificada mediante los métodos: USEPA SW846 (3ª Edición), Método de Extracción 3540A/3541 (Soxhlet), 3550 (sonicación) y Método de Análisis 8081 [129].

Para las algas y los moluscos, al no existir material de referencia certificado, se utilizó una mezcla de referencia de pesticidas que contenía 5 de los 6 compuestos de interés, a una concentración certificada (*Pesticide-Mix5*: 4,4'-DDD, 4,4'-DDE, 2,4'-DDT, 4,4'-DDT y Dieldrín a $10 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$), suministrada por Dr. Ehrenstorfer Reference Material y distribuida por Cymit Química (Barcelona, España).

Microextracción en fase sólida

Las fibras de microextracción en fase sólida (SPME) fueron suministradas por Supelco (Madrid, España). Las fibras utilizadas fueron: 50 μm Carbowax-TPR 100 (CW-TPR), 75 μm Carboxen-Polydimethylsiloxane (CX-PDMS), 100 μm Polydimethylsiloxane (PDMS), 60 μm Polydimethylsiloxane-Divinilbenzene (PDMS-DVB), 65 μm PDMS-DVB y 85 μm Polyacrylate (PA).

Extracción en fase sólida

Los cartuchos usados para la extracción en fase sólida (SPE) fueron: Envirelut-Pesticide 500mg, Bond Elut-ENV 500 mg y Mega BE-FL 1 g de Varian (Madrid, España) y Sep-Pak Vac C₁₈ 500 mg y Oasis HLB 200 mg de Waters (Madrid, España).

5.2.2. Disoluciones

Las disoluciones patrón de los pesticidas se prepararon disolviendo las cantidades adecuadas de cada uno de ellos en estado sólido en metanol, para conseguir una concentración de partida de $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Se almacenaron a 4°C. Las restantes disoluciones de menor concentración se prepararon por dilución de éstas.

Las disoluciones de los surfactantes se obtuvieron por dilución de éstos en agua Milli-Q hasta conseguir una concentración final de 5 % y 10 % (v/v). Las disoluciones de concentración inferior se preparaban por dilución de las anteriores.

Procedimientos Analíticos

6.1. Análisis Cromatográfico

El análisis de los extractos de las muestras fue llevado a cabo usando un cromatógrafo líquido de alta resolución con detector ultravioleta-visible [130, 131]. La separación y determinación de los compuestos bajo estudio se realizó inyectando 30 μl de extracto en el sistema cromatográfico para MAME y 50 μl para los extractos MAME-SPME y MAME-SPE. Se determinó el tiempo de retención y se midió la absorbancia de cada analito a su longitud de onda de máxima absorción.

Para la columna de 250mm los tiempos de retención se muestran en la Tabla A.1 (apartado A.2) y para la columna de 150mm se muestran en la Tabla A.4 (apartado A.3). El eluyente usado para la separación de los seis pesticidas organoclorados fue Metanol-Agua (85:15) a flujo isocrático $1\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Se obtuvo una relación lineal entre las áreas de pico y la concentración de analito en el rango comprendido entre 100-1000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para MAME y 50-1000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para MAME-SPME y MAME-SPE, con altos coeficientes de correlación (≥ 0.995).

6.2. Acondicionamiento de las muestras

Las muestras fueron acondicionadas, previo a la extracción, con la mezcla de los seis pesticidas organoclorados estudiados.

Las muestras de suelo y fango procedentes de distintas zonas de la isla de Gran Canaria (ver mapa, Figura 6.1), una vez recogidas, se dejaron secar al aire durante al menos dos semanas. Tras el secado se tamizaron, recogiendo la fracción correspondiente a un tamaño inferior a 0.30 mm.

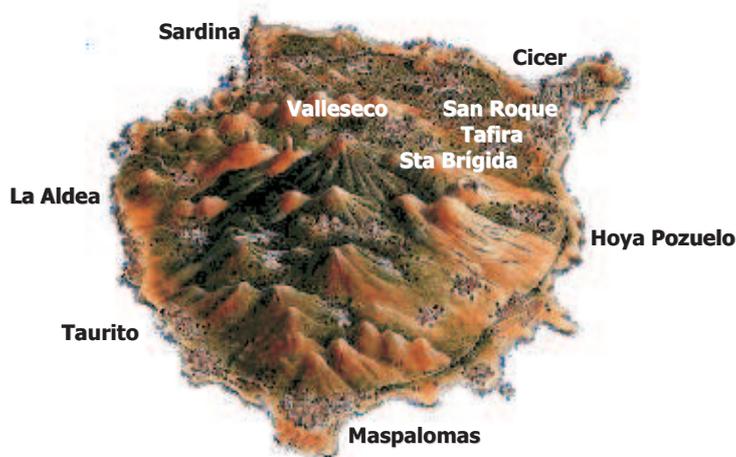


Figura 6.1: Zonas de recogida de muestras en la isla de Gran Canaria

Se pesaron 2 g de suelo, se les añadió el volumen necesario de la disolución que contenía la mezcla de pesticidas y se dejaron al aire a temperatura ambiente. Estas muestras se utilizaron 24 horas después del acondicionamiento.

Para muestras envejecidas realizamos el mismo proceso, pero se guardaron en oscuridad y cerradas durante el tiempo necesario (2 semanas en un caso y 2 meses

en otro). Después de este tiempo de acondicionamiento, se determinó el contenido de los analitos presentes en el suelo.

Para las muestras de fangos el acondicionamiento se realizó a través de una fortificación con acetona, que contenía la mezcla de pesticidas, de toda la muestra a analizar (24 horas antes). Se pesó la cantidad necesaria (10 ó 20 g) y se añadió un volumen suficiente de acetona para cubrir toda la muestra conteniendo la cantidad de analitos necesaria para obtener la concentración deseada. Este procedimiento permite obtener muestras más homogéneas, y por tanto, más reproducibles.

Las muestras de algas y moluscos se fortificaron igual que los fangos pero con metanol y acetona, respectivamente. Las algas no se fortificaron con acetona para evitar la extracción de los pigmentos, solubles en este disolvente.

6.3. Extracción micelar por microondas (MAME)

La muestra previamente acondicionada, se depositó en el vaso de extracción y se le añadió el volumen adecuado de la disolución de surfactante.

La cantidad de muestra a extraer dependerá de la matriz utilizada:

- SUELOS Y FANGOS: 2 gramos
- ALGAS: 0.5 gramos
- MOLUSCOS: 1 gramo

Después de cerrados, los vasos se introdujeron en el microondas y se les aplicó la potencia y tiempo previamente establecidos para realizar el proceso de extracción. Una vez fuera del microondas, y antes de abrirlos, los vasos se dejan durante un tiempo mínimo de 10 minutos a temperatura ambiente, para que se enfríen y evitar pérdidas por evaporación.

Se recoge todo el líquido sobrenadante que es filtrado mediante filtros de jeringa marca Millipore de 0.45 μm de poro y 25 mm de diámetro, antes de ser inyectado en el sistema cromatográfico o pasar a los siguientes pasos de preconcentración y limpieza (SPME y SPE).

6.4. Microextracción en fase sólida (SPME)

Antes de su utilización las fibras fueron acondicionadas durante 30 min en metanol (según instrucciones del fabricante).

Tras el estudio de todas las variables que afectan al proceso MAME-SPME y su optimización, se fijaron las siguientes condiciones:

Se tomaron 5 ml del extracto MAME y 7.5 ml de agua bidestilada y se introdujeron en un vial SPME de 15 ml con inmersión directa bajo las condiciones óptimas. La desorción de los compuestos se realizó en un vial cónico de 200 μl con 55 μl de metanol. Se inyectaron en el sistema cromatográfico 50 μl de dicho extracto.

6.5. Extracción en fase sólida (SPE)

Los cartuchos se acondicionaron con 5 ml de metanol y 5 ml de agua bidestilada antes de cada extracción. Se tomaron 5 ml de extracto MAME, se diluyeron con 20 ml de agua y el extracto diluido se pasó a través del cartucho SPE a un flujo de 5 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

Tras el proceso de absorción, se realizó un paso de lavado del cartucho con 5 ml de agua ultra pura para eliminar el remanente de surfactante que pudiese quedar, y diluir otros compuestos que hayan quedado retenidos para reducir las

interferencias. Los analitos retenidos fueron eluidos con 2 ml de metanol a un flujo de $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

Se inyectaron en el sistema cromatográfico $50 \mu\text{l}$ de dicho extracto.

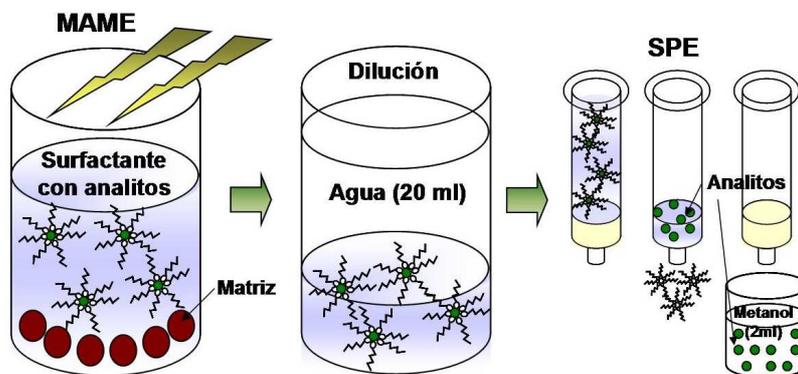


Figura 6.2: Representación de MAME acoplado con SPE

6.6. Extracción Soxhlet

Las cantidades de muestra usadas para la extracción fueron las mismas que en MAME. Para la extracción en el caso de algas se tomaron 0.5 g, y para la extracción en moluscos 1g.

Las muestras, previamente acondicionadas, fue sometida al proceso de extracción Soxhlet con hexano durante 24 horas con 6-8 ciclos/hora como propone el Método Oficial AOAC 970.52 para pesticidas organoclorados [132]. El extracto se llevó a sequedad con un rotavapor, se redisolvió en metanol (10 ml) y finalmente fue analizado en el cromatografo líquido donde se inyectaron $50 \mu\text{l}$.

6.7. Mezclas de Surfactantes

Los surfactantes usados en este estudio fueron:

- Polioxietilen 10 Lauril ether (POLE)
- Polioxietilen 10 Stearil ether
- Polioxietilen 10 Cetil ether
- Polioxietilen 10 Tridecil ether

Para intentar mejor la extracción y debido a la baja solubilización en agua de algunos de ellos a temperatura ambiente, se probaron diferentes mezclas de surfactantes:

- 70 % POLE + 30 % Polioxietilen 10 Stearil ether (Mezcla Stearil)
- 70 % POLE + 30 % Polioxietilen 10 Cetil ether (Mezcla Cetil)
- 70 % POLE + 30 % Polioxietilen 10 Tridecil ether (Mezcla Tridecil)

6.8. Características de los suelos y fangos

Se recogieron diferentes muestras de suelo de distintas regiones agrícolas de la isla de Gran Canaria (Islas Canarias, España). Las características físico-químicas obtenidas de estas muestras se describen en la Tabla 6.1.

Los fangos estudiados pertenecen a muestras recogidas en diferentes zonas costeras alrededor de la isla de Gran Canaria.

Suelo	Uso	Contenido		Cont.	Conduct.
		Arcilla (%)	pH	MO (%)*	($\mu\text{S}/\text{cm}$)
TAFIRA	Jardín	23.8	8.3	4.8	292
SAN ROQUE	Agrícola	14.6	7.9	12.5	3266
STA BRÍGIDA	Agrícola	12.8	5.9	3.9	483
VALLESECO I	Agrícola	32.1	4.8	4.4	202
VALLES. II	Agrícola	47.3	3.9	6.2	100

*MO: Materia Orgánica

Tabla 6.1: Características de los suelos estudiados

En la Tabla 6.2 se recogen las diferentes características físico-químicas de estos fangos así como su orientación geográfica.

Fango	Orientación Geográfica	Contenido		Cont.	Conduct.
		Arcilla (%)	pH	MO (%)*	($\mu\text{S}/\text{cm}$)
MASPALOMAS	Sur	0.8	9.3	0.4	2390
CICER	Noreste	6.3	8.8	0.6	304
LA ALDEA	Oeste	32.6	8.6	3.4	1925
SARDINA	Norte	0.1	9.1	0.6	1750
TAURITO	Suroeste	5.9	9.3	0.7	883
HOYA POZUELO	Sureste	3.8	8.6	1.1	345

*MO: Materia Orgánica

Tabla 6.2: Características de los fangos estudiados

6.8.1. Determinación del pH

Debido a la naturaleza sólida de la matriz, el pH de un suelo o fango, es el que se obtiene potenciométricamente en la suspensión obtenida por agitación del mismo con agua. El tiempo de agitación y de decantación elegidos deben ser suficientes para asegurar que la muestra en suspensión haya alcanzado el equilibrio químico con la fase líquida cuando se realice la lectura del pH. Al ser muestras orgánicas se tomaron 5 g con 20 ml de agua destilada; agitamos durante 1 minuto y dejamos decantar durante media hora [133]. Los pH medidos se muestran en la Tabla 6.1 y Tabla 6.2, para los suelos y fangos estudiados respectivamente.

6.8.2. Determinación de la Conductimetría

El análisis conductimétrico de las muestras se realizó de una manera equivalente a las medidas de pH, siguiendo el mismo procedimiento que se recoge en el apartado anterior. Los resultados obtenidos para cada una de las tierras se recogen en la Tabla 6.1 y para los fangos en la Tabla 6.2.

6.8.3. Granulometría – Determinación del Tamaño de Grano

El conocimiento de la composición granulométrica es fundamental en nuestro estudio, puesto que la distribución de las partículas del suelo o fango en función de su tamaño, tiene una gran influencia en el comportamiento físico y químico de los contaminantes. Para determinar el tamaño de grano de las muestras se tamizaron cada una de ellas con tamices de alambre de tamaños comprendidos entre 0.3 y 0.1 mm. Después de desechar las fracciones superiores a 0.3 mm se obtuvo la distribución granulométrica que se recoge en la Tabla 6.3 y en la Tabla 6.4, para los suelos y fangos respectivamente.

Suelo	Tamaño de Grano (%)			
	0.3 mm	0.2 mm	0.15 mm	≤0.1mm
TAFIRA	44.4	17.2	14.6	23.8
SAN ROQUE	52.1	20.0	13.2	14.6
STA BRÍGIDA	56.5	17.8	12.8	12.8
VALLESECO I	36.3	16.4	15.2	32.1
VALLES. II	25.2	13.2	14.4	47.3

Tabla 6.3: Composición granulométrica de los suelos

Suelo	Tamaño de Grano (%)			
	0.3 mm	0.2 mm	0.15 mm	≤0.1mm
MASPALOMAS	58.3	31.8	9.1	0.8
CICER	2.1	22.7	68.9	6.3
LA ALDEA	34.6	15.1	17.6	32.6
SARDINA	70.5	26.4	3.0	0.1
TAURITO	64.7	21.7	7.6	5.9
HOYA POZUELO	67.0	23.7	5.5	3.8

Tabla 6.4: Composición granulométrica de los fangos

6.8.4. Determinación del contenido en Materia Orgánica

Los métodos que se utilizan en la actualidad para la determinación de este parámetro se basan en la oxidación de la materia orgánica de la muestra por vía húmeda con dicromato potásico y ácido sulfúrico. Por su amplitud de aplicación en las condiciones más variadas, el método de Sauerlandt [134, 135] fue el méto-

do utilizado para determinar el contenido de carbono en las muestras de suelo estudiadas.

Se tomó 1 gramo de cada una de las muestras, después de dejarlas secar a temperatura ambiente. Tras tamizarla, la muestra tenía un tamaño de grano inferior a 0.3 mm. Se introdujeron en un vaso de precipitado de 250 ml y se añadieron 50 ml de ácido sulfúrico concentrado. La muestra se dejó en contacto con el ácido de 5 a 10 minutos, a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió, lentamente, agitando y enfriando bajo el grifo, 25 ml de una disolución 2 N de dicromato potásico. A continuación se calentó durante hora y media la mezcla a una temperatura de 125°C. Después de refrigerar la disolución, se enrasó en un matraz a 250 ml con agua destilada agitando convenientemente. Se tomaron 10 ml de esta disolución y se pasaron a un erlenmeyer; se añadieron 100 ml de agua destilada, 3 gotas de ácido fosfórico y 5 gotas de disolución de difenilamina. Posteriormente se valoró con sal de Mohr 0.2 N el exceso de dicromato potásico que no reaccionó con la materia orgánica.

Para determinar el contenido de carbono hay que tener en cuenta que 1 miliequivalente de dicromato potásico equivale a 3 miligramos de carbono. Los resultados obtenidos para las muestras de suelo se muestran en la Tabla 6.1 y para las muestras de fangos estudiadas, los resultados se presentan en la Tabla 6.2.

III

Resultados y Discusión

Extracción y Determinación de Pesticidas en Suelos y Fangos

Los pesticidas organoclorados han sido ampliamente usados en la agricultura para el control de plagas a lo largo de todo el mundo. Debido a esto, y a su altísima persistencia, están presentes en mayor o menor concentración en cualquier tipo de suelos, especialmente en suelos agrícolas [136]. A su vez, los pesticidas aplicados en tierra pueden ser transportados hasta los sistemas acuáticos por la lluvia, los ríos y escorrentías, llegando a los sedimentos y fangos, asociándose con partículas orgánicas e introduciéndose así en la cadena trófica [9, 137].

Por ello y por su alta toxicidad, hay un interés creciente en la optimización de nuevas metodologías analíticas que permitan la determinación de estos compuestos en distintas matrices, tales como los suelos y fangos, de una manera rápida, económica y segura para el medioambiente, como puede ser la extracción micelar asistida por microondas.

7.1. Optimización y aplicación de MAME en suelos

7.1.1. Optimización de variables en la extracción MAME

En el desarrollo de nuevos métodos analíticos es importante establecer aquellos valores de las variables experimentales que puedan influir en la señal a medir. En este sentido, una parte importante de los estudios a desarrollar se han dirigido a la optimización de estos factores. Cuando se utiliza la metodología de extracción asistida por microondas, los factores principales que deben tenerse en cuenta a la hora de optimizar dicho método son aquellos que pueden tener alguna influencia, no sólo sobre los analitos en estudio, sino también sobre la matriz en la que se encuentran y sobre el extractante utilizado en el proceso.

La optimización de la metodología MAME en suelos, se ha realizado para una mezcla de seis pesticidas organoclorados con 4 tipos de surfactantes diferentes.

Se estudiaron los siguientes factores:

- Volumen de surfactante
- Concentración de surfactante
- Potencia de irradiación
- Tiempo de irradiación

En las estrategias tradicionales, para alcanzar las condiciones óptimas de trabajo, sólo se cambia una variable cada vez, mientras permanecen constantes el resto de los factores. Esta aproximación requiere un gran número de experiencias y no permite el análisis de los cambios en algunas de las respuestas que pueden

tener lugar cuando dos o más factores se modifican simultáneamente. El diseño experimental constituye una alternativa a estas estrategias, permitiendo que se puedan variar simultáneamente los factores, a la vez que se estudian sus efectos [138, 139].

La primera fase consistió en un diseño factorial 2^4 (siendo 4 el número de variables a optimizar), el cual permite obtener la influencia que tiene cada variable en la recuperación y las posibles interacciones existentes entre las variables.

Con este diseño se toma el valor máximo y mínimo de cada variable: Potencia- 100 y 800 W, Tiempo- 2 y 14 min, Volumen de Surfactante- 5 y 15 ml y Concentración de Surfactante- 1 y 5 % (v/v). Combinando los valores dados de dichos parámetros entre sí, se obtiene un total de 16 posibles ensayos.

El diseño se realizó de tal forma que las muestras se analizaron de manera aleatoria para evitar la influencia de variables ocultas. En todos los casos las muestras se realizaron por duplicado.

Con este diseño lo que se obtiene es una tabla de correlaciones, donde se observan las correlaciones de cada variable con la recuperación (correlación parcial) y las correlaciones de las variables entre sí (correlación bivariada). Las correlaciones se representan en valores que van desde -1 hasta 1 . Siendo -1 y 1 las correlaciones máximas, negativa y positiva respectivamente, y 0 la correlación mínima.

El estudio se realizó para cuatro surfactantes diferentes, POLE y mezclas de POLE con otros surfactantes como el cetil, stearyl y tridecil, para comprobar la viabilidad de las mismas en la extracción.

La optimización de los factores antes señalados se llevó a cabo con una tierra agrícola procedente de Valleseco (Gran Canaria) para el caso de la mezcla cetil y stearyl, y una tierra de Tafira (Gran Canaria) para el caso de la mezcla tridecil y POLE. Se utilizaron 2 g de tierra con un tamaño de grano inferior a 0.30 mm, y para la optimización de todas las variables se utilizó un diseño experimental de tipo factorial en varias fases [140, 80].

Para el caso de la mezcla POLE-cetil, las correlaciones indicaron que la variable que más influye en la recuperación para la mayoría de los compuestos es la concentración de surfactante, que el volumen prácticamente no influye en la recuperación y las variables más relacionadas entre sí son la potencia y la concentración (ver Tabla 7.1). Para el resto de los surfactantes las correlaciones obtenidas en todos los casos indicaron el mismo resultado.

	4,4'-DDD	Dieldrin	4,4'-DDT	2,4'-DDT	4,4'-DDE	Aldrin
POTENCIA	0.245	0.331	0.239	0.050	0.366	0.322
TIEMPO	-0.008	0.403	-0.006	-0.055	0.249	0.201
VOL.SURF	-0.091	-0.069	-0.246	-0.336	-0.090	-0.808
CON.SURF	0.587	0.197	0.599	0.595	0.538	0.248
PT X CON	-0.1832	-0.1474	-0.1838	-0.0371	-0.2504	-0.2429
TP X CON	0.0056	-0.0088	-0.0048	0.0408	-0.1638	0.0980
PT X TP	0.0019	-0.0717	0.0016	0.0028	-0.1009	0.0842

Tabla 7.1: Correlaciones entre variables

Efecto del Volumen de Surfactante

El volumen de surfactante, a pesar de haber sido incluido en el diseño experimental inicial, obteniéndose que esta variable no afectaba a la recuperación, hay que estudiarlo de manera independiente, ya que es un factor que influye sobre la temperatura alcanzada en el interior del vaso.

En un estudio posterior al diseño experimental se analizaron cómo diferentes volúmenes de surfactante sí podían afectar a la recuperación. Para este estudio se tomaron: 5, 7, 8 y 10 ml de surfactante.

Los resultados indicaron que volúmenes inferiores a 7 ml no son suficientes para impregnar de manera homogénea la muestra (2 g de tierra) y que el intercambio de analitos entre la matriz y el surfactante se produjese de una manera eficiente, y volúmenes superiores a 10 ml provocan un indeseable aumento de la temperatura cuando era sometida a la radiación microondas.

Por ello, al tratarse de un intervalo de estudio muy estrecho (7-10 ml) se fijó un volumen intermedio para todo el proceso de optimización: 8 ml.

Efecto de la Concentración de Surfactante

En el diseño experimental inicial se obtuvo que la variable que más influencia tiene en la recuperación es la concentración de surfactante, y que a su vez, esta variable está relacionada con la potencia del microondas (ver Tabla 7.1). Por tanto, para obtener el valor de concentración óptima de surfactante será necesario aplicar un diseño factorial 3^2 con duplicado en el punto central, donde 2 es el número de variables, en este caso representa la concentración y la potencia [54]. Este diseño experimental permite obtener una superficie de respuesta entre ambas variables, combinando tres valores de la variable Potencia (100, 550 y 1000 W) con tres

valores de la variable Concentración de Surfactante (1, 3 y 5 %, v/v). Teniendo en cuenta que se realiza un duplicado del punto central, se trata de un diseño de 10 muestras. Con la superficie de respuesta obtenida se puede calcular el máximo de la variable para cada compuesto estudiado.

La Figura 7.1 muestra las superficies de respuesta de los porcentajes de recuperación obtenidos para concentraciones de surfactantes comprendidas entre 1 y 5 % (v/v) y potencias entre 100 y 1000 vatios para todos los surfactantes estudiados. En las gráficas se ha representado en todos los casos el mismo analito (4,4'-DDT), y en todos se obtiene una tendencia similar.

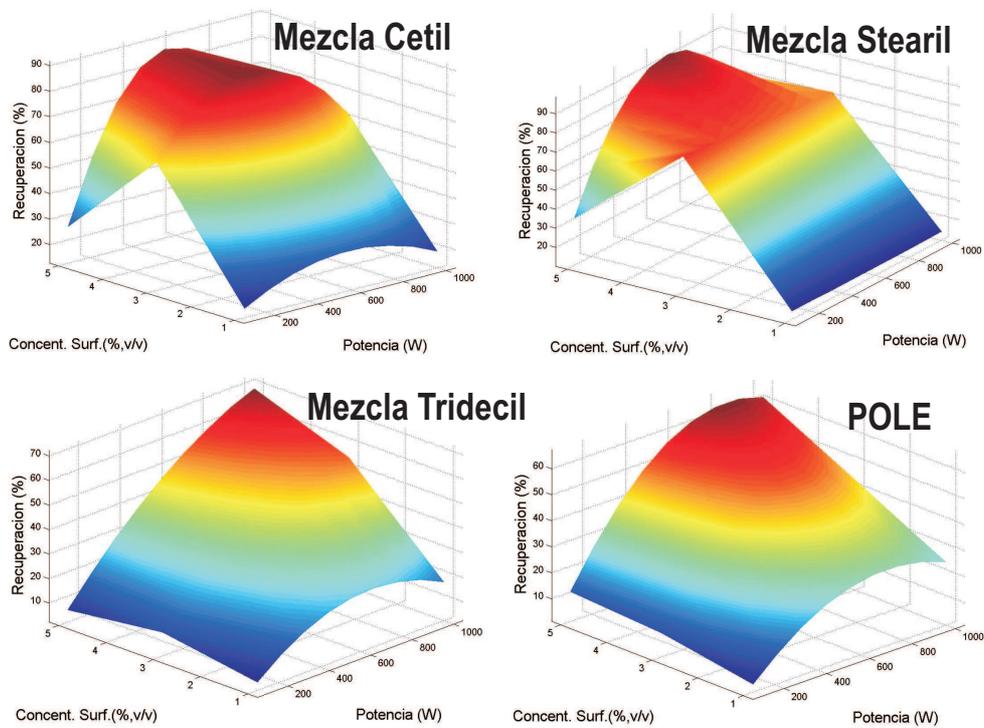


Figura 7.1: Superficies de respuesta potencia-concentración para los surfactantes estudiados

El resultado obtenido fue el mismo para todos los surfactantes, tanto para mezclas como para el POLE, la concentración óptima de surfactante es 5 % (v/v) (ver Figura 7.1).

No se utilizaron concentraciones mayores de surfactante (>5 %, v/v), porque se comprobó experimentalmente que por encima de este valor, la viscosidad del extractante aumentaba y debido a esto, la eficiencia de extracción disminuía.

Potencia y Tiempo de irradiación

A pesar de que en el diseño experimental inicial no se observa una clara relación entre las variables potencia y tiempo, debido a la influencia que producen ambos factores en la temperatura (variable secundaria no considerada en el diseño pero que sí ha sido controlada a lo largo de todo el estudio), se consideró necesario incluirlas a ambas en un diseño factorial 3^2 de tal forma que pudiésemos optimizar ambas variables conjuntamente.

Este diseño experimental permite obtener una superficie de respuesta entre ambas variables, combinando tres valores de la variable Potencia (100, 550 y 1000 para mezcla cetil y stearyl y 500, 750 y 1000 W para mezcla tridecil y POLE) con tres valores de la variable Tiempo (2, 8 y 14 min). Teniendo en cuenta que se realiza un duplicado del punto central, se trata de un diseño de 10 muestras. Con la superficie de respuesta obtenida se puede calcular el máximo de ambas variables para cada compuesto estudiado.

La Figura 7.2 muestra los valores óptimos de potencia y tiempo para cada surfactante. En las gráficas se ha representado en todos los casos el mismo analito (4,4'-DDT), pero todos presentan una tendencia similar.

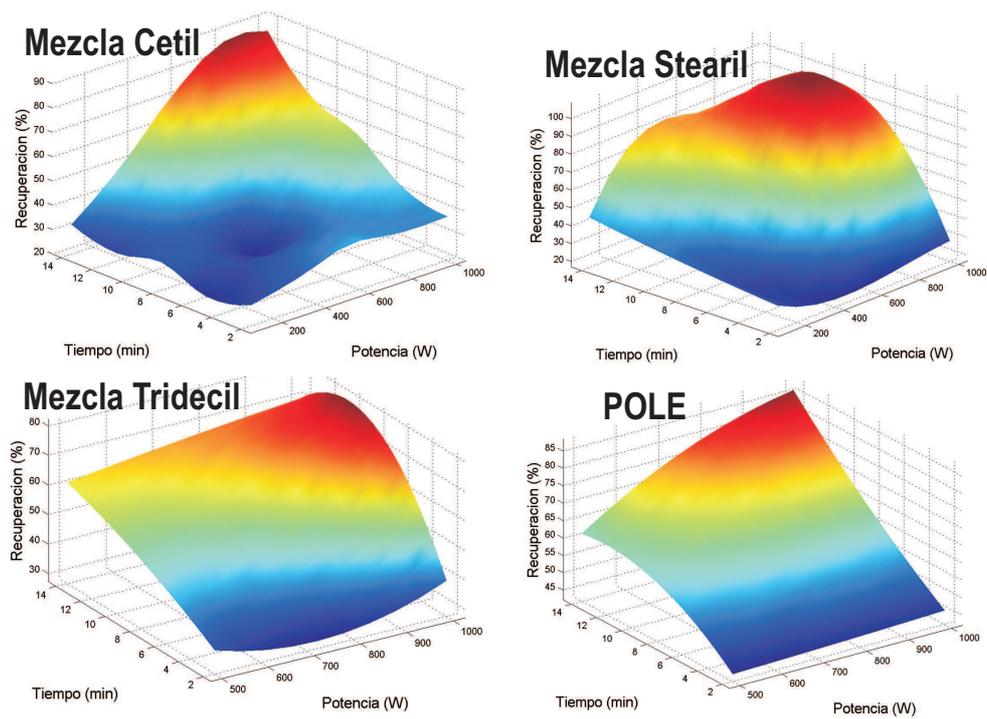


Figura 7.2: Superficies de respuesta potencia-tiempo para los surfactantes estudiados

Los valores óptimos para cada surfactante son:

- *Mezcla POLE-Cetil:* 750 W - 14 minutos
- *Mezcla POLE-Stearil:* 775 W - 8 minutos
- *Mezcla POLE-Tridecil:* 1000 W - 8 minutos
- *POLE:* 1000 W - 14 minutos

7.1.2. Parámetros analíticos y validación

Análisis Cromatográfico

El análisis de las muestras extraídas se realizó usando un cromatógrafo líquido de alta resolución con detección ultravioleta-visible [130, 141].

La separación y determinación de los compuestos bajo estudio se llevó a cabo inyectando 30 μl de extracto en el cromatógrafo líquido y se midió la absorbancia de cada analito, correspondiente a la máxima absorbancia (Tabla A.1, apartado A.2). El cromatograma obtenido para la mezcla de seis pesticidas, utilizando la mezcla POLE-cetil como extractante, se muestra en la Figura 7.3.

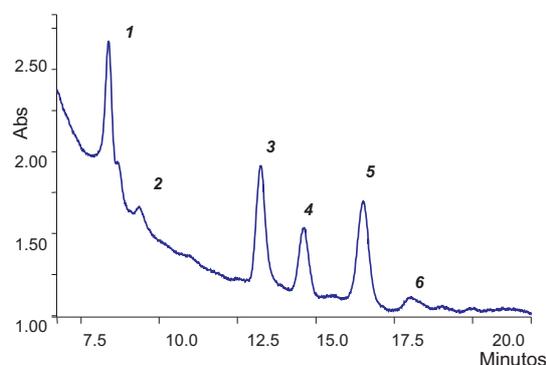


Figura 7.3: Cromatograma del extracto de suelo de Valleseco (mezcla cetil)

Se puede observar que la fase móvil usada permite una buena separación de los analitos con cortos tiempo de análisis. Los cromatogramas obtenidos para el resto de surfactantes fueron similares. En el cromatograma se observa que la separación entre picos es suficiente para cuantificar satisfactoriamente los diferentes analitos. Además, la señal del surfactante aparece en los primeros 5 minutos de cromatograma, por lo que no interfiere en los picos de interés.

Parámetros Analíticos

Para determinar la precisión del método de extracción propuesto, se realizó un estudio estadístico del mismo con seis muestras de suelo de Valleseco para el caso de la mezcla POLE-cetil y POLE-stearil, y de Tafira para el caso de la mezcla POLE-tridecil y para el POLE. Las muestras se acondicionaron con la mezcla de seis pesticidas organoclorados, de manera que la concentración final de cada uno de ellos fuese la misma que la utilizada en el proceso de optimización y se dejaron secar durante 24 horas.

Estas muestras fueron sometidas al proceso completo de extracción asistida por microondas con los cuatro surfactantes estudiados (las tres mezclas y el POLE) y a la posterior separación y determinación por HPLC con detección UV.

Analito	Desviación Estándar Relativa (%)			
	M. Cetil	M. Stearil	M. Tridecil	POLE
4,4'-DDD	8.4	9.7	6.1	7.4
Dieldrín	7.1	9.7	4.1	5.5
4,4'-DDT	6.5	5.2	7.2	7.3
2,4'-DDT	5.2	7.5	8.8	8.4
4,4'-DDE	7.4	8.2	6.4	7.9
Aldrín	5.4	9.1	8.5	9.2

Tabla 7.2: Valores de desviación estándar relativa (%) obtenida para la mezcla de seis pesticidas tras aplicar MAME

A estas muestras se les calcularon las desviaciones estándares relativas para todos los compuestos con cada uno de los surfactantes (Tabla 7.2). Los límites de detección se calcularon como tres veces la concentración correspondiente a la señal

del ruido para cada pesticida [142], y varía entre 64 y 804 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ para todos los compuestos estudiados (Tabla 7.3).

Analito	Límites de Detección ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$)			
	M. Cetil	M. Stearil	M. Tridecil	POLE
4,4'-DDD	108	268	100	64
Dieldrín	792	732	692	248
4,4'-DDT	164	172	204	168
2,4'-DDT	84	284	216	80
4,4'-DDE	132	148	92	68
Aldrín	804	592	596	512

Tabla 7.3: Límites de detección obtenidos para la mezcla de seis pesticidas tras aplicar MAME

Validación del método con una muestra de suelo certificada

Algunos autores consideran que las recuperaciones obtenidas con muestras enriquecidas no son comparables a las obtenidas con muestras reales debido a los procesos e interacciones que tienen lugar en este tipo de muestras [143].

Los analitos añadidos son ligeramente retenidos en la superficie de la matriz, mientras que los contaminantes nativos son más fuertemente retenidos en el interior de los poros de la matriz. Por ello, los resultados obtenidos en la eficiencia de la extracción en muestras acondicionadas pueden ser sobreestimados. Esta es la razón por la que es importante validar el proceso de extracción desarrollado aplicándolo a un material certificado [144].

Con este fin, se adquirió un material de referencia certificado conteniendo cuatro de los pesticidas estudiados (CRM804-050). La muestra de suelo (de carácter arenoso) procede de una región agrícola al Oeste de los Estados Unidos. Las concentraciones de cada uno de los pesticidas fue certificada mediante USEPA SW846 (3rd edición), método de extracción 3540A/3541 (soxhlet), 3550 (sonicación) y método de análisis 8041 [129].

La Tabla 7.4 muestra los pesticidas presentes en la muestra, los valores de concentración medios certificados, la desviación estándar relativa de estas concentraciones, los intervalos de confianza para cada uno de los compuestos y los intervalos de predicción.

Compuesto	Valor Refer. ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	SD^a ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Int.Confianza ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Int.Predicción ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
4,4'-DDD	1.531	0.476	1.294-1.767	0.499-2.562
Dieldrín	1.863	0.655	1.539-2.186	0.437-3.288
4,4'-DDT	1.060	0.275	0.926-1.195	0.465-1.655
4,4'-DDE	1.520	0.410	1.325-1.715	0.633-2.407

a) SD: Desviación estándar

Tabla 7.4: Datos del material certificado CRM804-050

En la Figura 7.4 se muestra el cromatograma obtenido a partir de un extracto de este material certificado después de aplicar la extracción asistida por microondas a una muestra del mismo, utilizando POLE como extractante.

En la Tabla 7.5 se muestran las concentraciones obtenidas de los pesticidas al aplicar MAME al material certificado con cada uno de los surfactantes estudiados

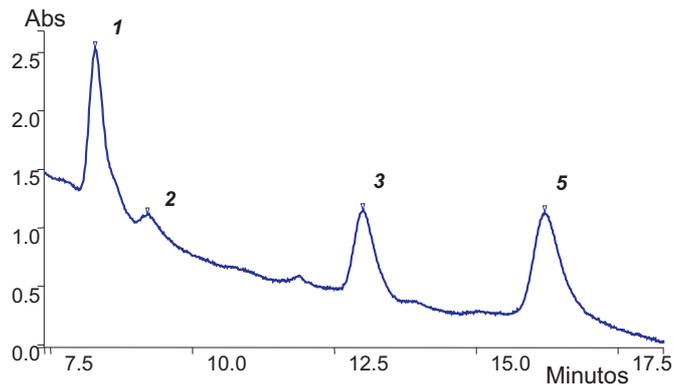


Figura 7.4: Cromatograma del extracto obtenido del material certificado

(las tres mezclas y el POLE) junto con el valor de desviación estándar de cada resultado. Se utilizaron 2 gramos de muestra y se les aplicó las condiciones optimizadas de potencia y tiempo para cada surfactante. Como se puede observar, las concentraciones obtenidas están, para todos los surfactantes, dentro del intervalo de confianza esperado, salvo para la mezcla tridecil en la que las concentraciones obtenidas se encuentran dentro del intervalo de predicción dado, indicando que el procedimiento de extracción propuesto es válido para este tipo de matriz.

Comp.	Concentración Encontrada ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)			
	Mezcla Cetil	Mez. Stearil	Mez. Tridecil	POLE
4,4'-DDD	1.582±0.163	1.733±0.009	1.275±0.010	1.363±0.040
Dieldrín	1.862±0.092	2.242±0.084	1.792±0.040	1.546±0.112
4,4'-DDT	0.917±0.067	1.079±0.015	0.794±0.019	0.840±0.010
4,4'-DDE	1.099±0.118	1.502±0.022	1.114±0.040	1.323±0.059

Tabla 7.5: Extracción de pesticidas usando MAME en el material certificado CRM804-050

7.1.3. Aplicación de MAME a diferentes muestras de suelos

Tras optimizar los factores de los que depende el método de extracción por microondas y validar el método con una muestra certificada, diferentes muestras de suelos fueron sometidas a las condiciones óptimas para cada surfactante.

Estos suelos proceden de diferentes zonas de la isla de Gran Canaria (ver mapa: Figura 6.1, apartado 6.2) y presentan características diferentes: tamaño de grano, porcentaje de materia orgánica, conductividad y pH [145, 146], descritas previamente en la Tabla 6.1 (apartado 6.8).

Las muestras fueron previamente acondicionadas, tal y como se explica en el apartado 6.2, con la mezcla de seis pesticidas organoclorados. La concentración añadida para el acondicionamiento se escogió entre los niveles típicos de pesticidas que pueden ocurrir en suelos contaminados ($1.2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) [137, 147]. El suelo fue acondicionado a temperatura ambiente durante 24 horas antes del análisis.

En la Figura 7.5 se muestran los cromatogramas de los extractos de muestras de suelo de Tafira sin acondicionar y acondicionada con la mezcla de pesticidas, después de aplicar el método desarrollado usando POLE como extractante.

En la Figura 7.5.a puede observarse la intensa señal que producen los componentes polares de la tierra al principio del cromatograma, que a pesar de su intensidad, no interfiere con los picos de interés. En la Figura 7.5.b se ha suprimido la señal inicial para poder observar mejor los picos de los analitos de interés.

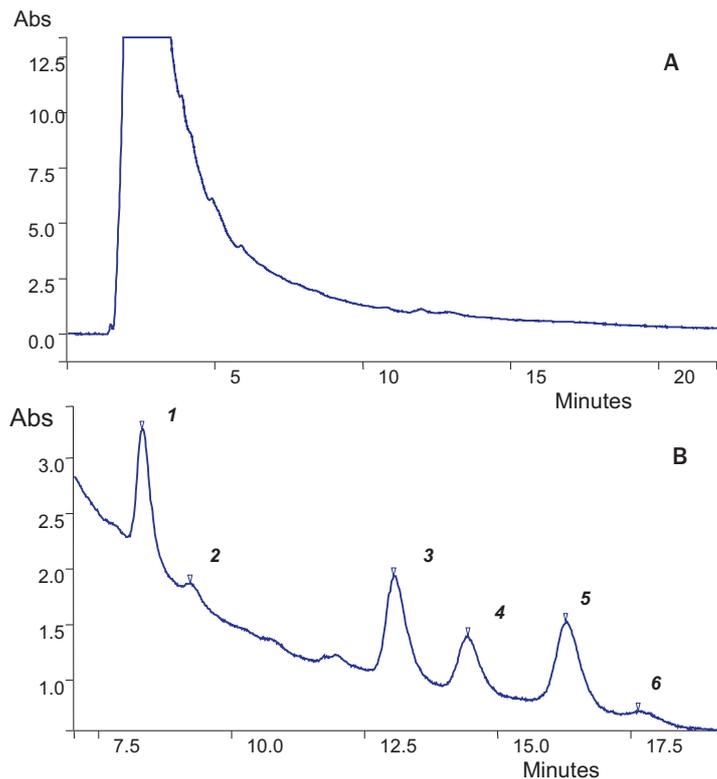


Figura 7.5: Cromatogramas de los extractos sin acondicionar (A) y acondicionada (B) con pesticidas ($\lambda = 238nm$)

En la Figura 7.6 se muestran las recuperaciones obtenidas utilizando la tierra de Sta Brígida para los cuatro surfactantes utilizados, las tres mezclas (POLE-cetil, POLE-stearil y POLE-tridecil) y el POLE. En dicha figura se puede observar que, en general, las recuperaciones son bastantes satisfactorias para todos los surfactantes. Esto demuestra que el método es aplicable a la extracción de pesticidas organoclorados en suelos de diferentes características.

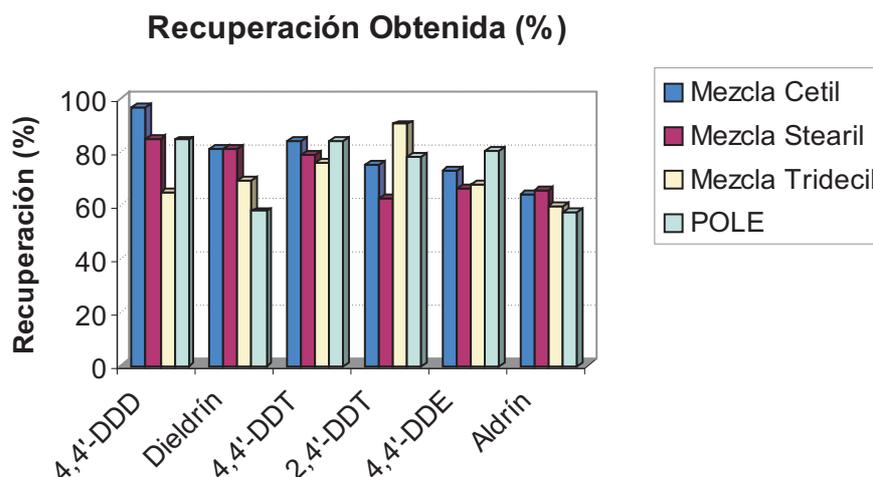


Figura 7.6: Recuperaciones obtenidas con la tierra de Sta Brígida para los cuatro surfactantes, las tres mezclas y el POLE

Influencia de las características de la matriz

Si comparamos la extracción obtenida utilizando la mezcla POLE-stearil como extractante para los diferentes tipos de suelo (Figura 7.7), observamos que las recuperaciones varían en función del tipo de suelo.

Las tierras con alto contenido en materia orgánica (San Roque) presentan buenas recuperaciones (ver Figura 7.7) debido a que el surfactante puede también extraer sustancias húmicas, las cuales pueden estar asociadas químicamente a los pesticidas [148, 149]. Estas recuperaciones pueden disminuir cuando las temperaturas son muy altas debido a la degradación de la materia orgánica; este fenómeno se observó en las condiciones más extremas del diseño experimental (1000 W-14 min).

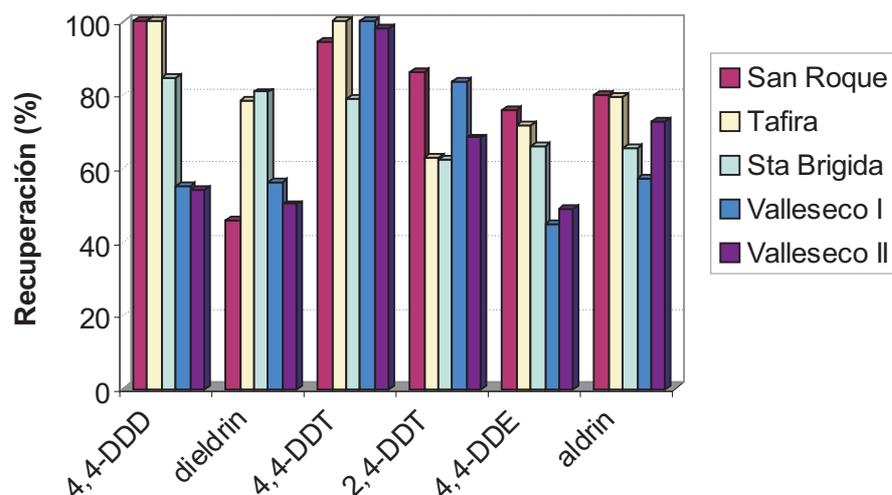


Figura 7.7: Recuperaciones obtenidas con las distintas tierras usando la mezcla stearyl como extractante

La granulometría del suelo es un factor muy importante en los procesos de absorción y adsorción de los pesticidas en el suelo [150]. El material arcilloso es la fracción, con diferencia, que más influye en los procesos de absorción de las cuatro fracciones que componen principalmente un suelo: arcilla, limo, arena y grava (en este estudio las gravas se han retirado al tamizar la muestra). La arcilla produce la mayor absorción al ser el material más fino, con mayor relación superficie/volumen y con alta carga superficial [151]. Este hecho tiene un efecto relevante en la recuperación, cuanto mayor es la cantidad de material arcilloso menor es la recuperación. En la Figura 7.7 se observa que los suelos con los que se obtiene menor recuperación son Valleseco I y Valleseco II, siendo ambos los que contienen mayor porcentaje de material arcilloso tienen (ver Tabla 6.3).

La conductividad de los suelos es un factor que afecta directamente a la temperatura que se obtiene en el interior de los vasos al aplicar MAME. La temperatura es una variable que, a pesar de no haber sido incluida en el diseño experimental, se controló en todo momento y se observó que la temperatura óptima de extracción variaba de un surfactante a otro entre un rango de 130°C a 160°C. Pero el hecho más notable relacionado con la temperatura se observó en las aplicaciones. Las tierras con alta conductividad (como San Roque) alcanzaban esta temperatura de extracción con potencias menores a las optimizadas; de hecho, si se aplicaba la potencia óptima aumentaba excesivamente la temperatura y disminuía la recuperación. Se observó que la conductividad y la temperatura eran variables que tenían una correlación logarítmica; para el caso del surfactante mezcla stearil, por ejemplo, esta correlación venía dada por la ecuación:

$$y = 9.2032 \ln x + 93.7$$

donde y es la temperatura y x la conductividad, con un coeficiente de correlación $R^2 = 0.980$. Como consecuencia de este hecho, para realizar las aplicaciones con la tierra San Roque fue necesario disminuir, para cada surfactante, la potencia un 30% con respecto a la optimizada (calculado a partir de las ecuaciones de correlación).

Influencia del envejecimiento de las muestras de suelo

Cuando se realiza la extracción de contaminantes de muestras de suelos, los porcentajes de extracción disminuyen con el tiempo de envejecimiento [152, 153]. Esto es debido a que a medida que aumenta el tiempo de contacto entre los analitos y las partículas del suelo las fuerzas que se establecen entre ambos son diferentes. En la primeras etapas los analitos son incorporados mediante adsorción, es decir,

quedan retenidos en la superficie externa de las partículas del suelo, prevaleciendo las fuerzas de van der Waals. Estas fuerzas, las más débiles entre las interacciones moleculares, aumentan su intensidad con el tamaño de la partícula, por lo que este factor tiene cierta influencia en la adsorción de los analitos. A medida que transcurre el tiempo, las moléculas de los contaminantes se incorporan a la estructura interna de las partículas del suelo. A este fenómeno se le denomina absorción. A veces se utiliza también el término “secuestación” para referirse a este mecanismo [154, 155].

La influencia del tiempo de envejecimiento en la extracción de los pesticidas organoclorados en suelos fue estudiada analizando muestras de los cinco tipos de suelos en diferentes períodos de tiempo, hasta nueve semanas después de ser acondicionadas. El acondicionamiento de las muestras se realizó de la misma forma que para las muestras frescas.

En la Figura 7.8 se muestran las recuperaciones obtenidas para la tierra Valleseco I con la mezcla cetil, a las 24 horas (muestra fresca), 2 semanas y 9 semanas después de su acondicionamiento.

Los resultados obtenidos con el estudio de envejecimiento de las muestras indican que, tal y como se esperaba, las recuperaciones disminuyen con el tiempo para todos los compuestos, lo cual se puede explicar por procesos de absorción.

En algún caso se observó que la disminución en la recuperación prácticamente se estabilizaba a las 2 semanas, pudiendo deberse a que estos procesos ocurriesen en dicho período. Además, ninguno de los metabolitos del DDT incrementó con el

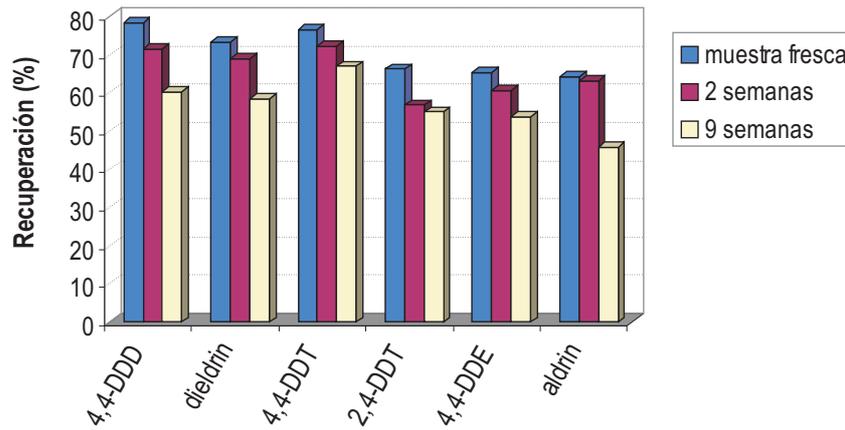


Figura 7.8: Recuperaciones obtenidas con Valleseco I a distintos tiempos de envejecimiento

tiempo, lo que permite asegurar que no están ocurriendo procesos de degradación en las 9 semanas que duró el estudio.

Los resultados obtenidos al aplicar MAME al resto de las tierras a diferentes tiempos de envejecimiento, con los cuatro surfactantes, fueron similares a los que se muestran en el Figura 7.8.

Estos resultados indican que el método desarrollado permite determinar la presencia de pesticidas en muestras reales y muestran la viabilidad del método como alternativa a los métodos convencionales.

7.2. Optimización de MAME-SPME en suelos

Se comprobó que el déficit obtenido en algunos casos en la recuperación no era debido al proceso de extracción en sí, sino a la determinación. Los extractos de suelo contienen gran cantidad de sustancias orgánicas que pueden interferir en la señal cromatográfica de los picos de interés, los componentes polares o semipolares presentes en la tierra producen una intensa señal que puede llegar a enmascarar la de los compuestos estudiados. Con ellos la línea base se vuelve irregular y es difícil definir con exactitud la base de los picos, complicando la determinación del área de los mismos.

Debido a esto consideramos que podría ser adecuado introducir un paso de limpieza o clean-up antes de la determinación cromatográfica. Lo realizamos utilizando la microextracción en fase sólida (SPME). Con la SPME realizamos una limpieza y preconcentración de la muestra en un solo paso [156].

Para el estudio del acoplamiento MAME-SPME y su optimización se utilizaron dos de los surfactantes que mejor resultado dieron en la extracción MAME:

- MEZCLA STEARIL
- POLE

El procedimiento SPME implica procesos de difusión en los cuales existe una partición entre los analitos presentes en la muestra y la fase polimérica estacionaria. La eficiencia de extracción de analitos por SPME puede variar ampliamente dependiendo de la naturaleza de la matriz, del tiempo de absorción, desorción, temperatura, adición de sal [97]; pero a su vez estas variables dependen del tipo de fibra usada [119].

7.2.1. Optimización de las variables en SPME

Estudio del tipo de fibra

El primer punto a tener en cuenta en la optimización SPME es la selección de la fibra más apropiada para la extracción de los analitos. Para poder elegir la mejor fibra para la extracción de pesticidas organoclorados con el proceso MAME-SPME, se estudiaron seis fibras comerciales diferentes: 50 μm Carbowax-TPR 100 (CW-TPR), 75 μm Carboxen-Polydimethylsiloxane (CX-PDMS), 100 μm Polydimethylsiloxane (PDMS), 60 μm Polydimethylsiloxane-Divinilbenzene (PDMS-DVB), 65 μm PDMS-DVB y 85 μm Polyacrylate (PA).

Con el objeto de comparar las eficiencias de extracción de dichas fibras, se seleccionaron condiciones de trabajo intermedias. Estas condiciones, en la mayor parte de los casos, son suficientes para que se establezca el equilibrio entre la disolución y la fibra [116].

Las condiciones seleccionadas fueron: 60 min para el tiempo de absorción a temperatura ambiente y 10 min como tiempo de desorción. La desorción se realizó en 80 μl de metanol. El vial utilizado para la extracción MAME-SPME fue un vial de 4 ml que contenía 2 ml del extracto MAME y 2 ml de agua bidestilada, esta dilución se realizó para disminuir el efecto de competencia por el analito entre la fibra y el surfactante.

Los resultados obtenidos, como áreas de pico obtenidas, para las seis fibras se muestran en la Tabla 7.6 para todos los compuestos estudiados, utilizando el surfactante mezcla stearyl. Para el POLE los resultados fueron equivalentes.

	4,4'-DDD	Dieldrin	4,4'-DDT	2,4'-DDT	4,4'-DDE	Aldrin
PDMS-DVB60	43477	25858	42543	30029	48633	26836
PDMS-DVB65	38799	24185	37371	25237	44576	22179
PDMS	4565	10424	7514	8657	15982	10813
PA	9456	1376	5910	1572	6712	3846
CX-PDMS	31409	12644	31039	19607	34895	15548
CW-TPR	18260	8068	16566	8910	18776	13710

Tabla 7.6: Áreas de pico obtenidas en el estudio del tipo de fibra

Se puede observar en dicha tabla que la fibra con la que se obtiene mejores resultados para la extracción MAME-SPME de estos pesticidas es la 60 μm Polydimethylsiloxane-Divinilbenzene (PDMS-DVB), por lo que esta fibra será la utilizada para la optimización y análisis.

Estudio del tiempo de absorción

Para optimizar el proceso de extracción SPME, uno de los aspectos más importantes es la determinación del tiempo que es necesario hasta que se establece el equilibrio entre la muestra y el revestimiento de la fibra. La Figura 7.9 muestra la variación de las áreas obtenidas con diferentes tiempos de extracción (de 20 a 60 min) para tres de los pesticidas organoclorados estudiados (4,4'-DDT, 4,4'-DDD y 4,4'-DDE) utilizando mezcla stearyl (A) y POLE (B) como surfactantes.

Como se puede observar en las figuras, para el surfactante mezcla stearyl, la cantidad extraída de los tres compuestos (presentadas como área de pico) aumenta considerablemente con el tiempo de extracción hasta los 50 minutos.

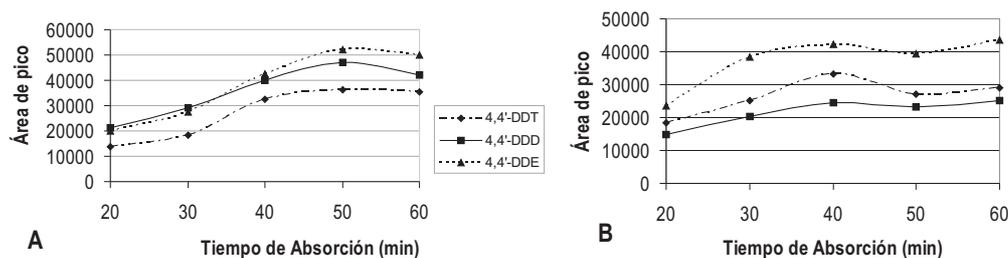


Figura 7.9: Estudio del tiempo de absorción para mez. stearyl (A) y POLE (B)

Un incremento en el tiempo de extracción a partir de este punto no refleja un aumento proporcional en el área de pico para estos pesticidas (para los demás compuestos los resultados fueron similares). Con el POLE la mayor parte de los analitos alcanzan el equilibrio a partir de 30-40 min.

Para obtener una buena sensibilidad en el análisis de todos los compuestos, se seleccionó 50 min como tiempo óptimo de extracción para el surfactante mezcla stearyl y 40 min para el POLE, con los cuales, además, se obtienen buenas reproducibilidades y aceptables tiempos de análisis.

Estudio del tiempo de desorción

La desorción de los analitos se realizó con modo estático por inmersión directa de la fibra PDMS-DVB en un vial cónico de vidrio de 200 μl con 80 μl de metanol antes de ser inyectado en el sistema HPLC-UV.

El tiempo de desorción estudiado se varió entre 2 y 12 min, observando en el caso de la mezcla stearyl, que el área de pico de los analitos aumenta ligeramente con el tiempo de desorción hasta los 6 min (Figura 7.10.A); después de este tiempo, las áreas de pico se mantienen constantes, mostrando que la desorción de los analitos se ha producido.

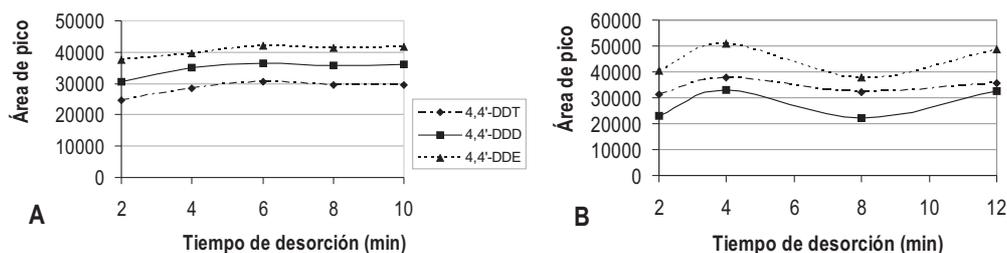


Figura 7.10: Estudio del tiempo de desorción para mez.stearil (A) y POLE (B)

Para el POLE a partir de 4 min no se produce un incremento significativo en el área de pico (Figura 7.10.B), lo que muestra que a partir de este tiempo, la desorción de los analitos ya se ha producido, por lo que tiempos mayores no provocan un aumento en la señal.

Por tanto, los tiempos de desorción seleccionados fueron: para la mezcla stearyl 6 min y para el POLE 4 min.

Estudio de la temperatura de extracción

La temperatura de extracción juega un papel importante en el proceso de absorción de los analitos, porque ésta influye en los procesos de transferencia de masa y en los coeficientes de partición de los analitos [116]. La influencia de la temperatura de extracción se estudió en el rango de 25-60°C para el tiempo de extracción optimizado en cada caso.

En la Figura 7.11 se puede observar para la mezcla stearyl (A) y para el POLE (B), que temperaturas de extracción superiores a 40°C producen un descenso en el área de pico, mientras que a temperaturas inferiores a 40°C la cantidad absorbida (representada como área de pico) es prácticamente constante.

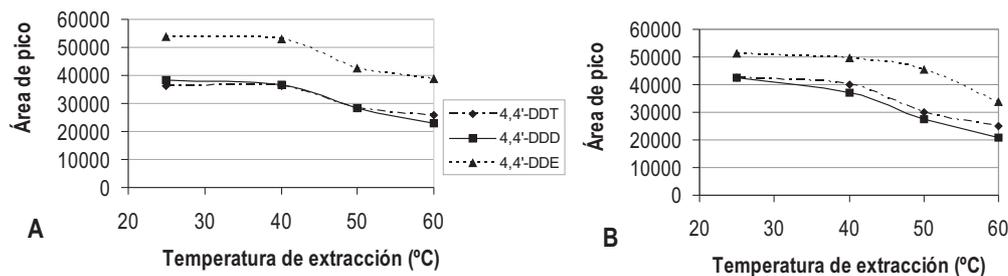


Figura 7.11: Estudio de la temperatura de extracción para la mezcla stearyl (A) y POLE (B)

Esto es debido a que la absorción puede ser un proceso exotérmico (en función del tipo de compuestos y fibra), y que la cantidad de analito absorbida disminuya con el aumento de temperatura [92, 157]. Por ello, decidimos realizar todas las medidas a temperatura ambiente (25°C).

Estudio de la fuerza iónica del medio

Otro parámetro que puede afectar en el proceso de extracción es la fuerza iónica de la muestra. La adición de sal normalmente produce un incremento en la extracción con la fibra de SPME [157], pero también con el surfactante [89], y como ambos efectos son opuestos, la eficiencia de la fibra puede verse reducida.

Para determinar el efecto que la adición de NaCl tiene en la eficiencia de extracción para los pesticidas organoclorados, añadimos distintas concentraciones de sal a la muestra (entre 0% y 30%, m/v).

La Figura 7.12 muestra los resultados obtenidos para tres pesticidas representativos, obteniendo resultados similares para el resto de compuestos. Como se puede observar en dicha figura, la adición de sal produce un descenso en el área de pico obtenida para todos los pesticidas en ambos surfactantes.

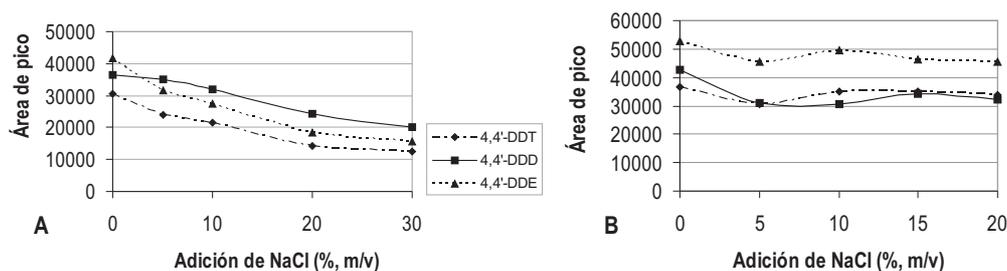


Figura 7.12: Estudio de la fuerza iónica del medio para la mezcla stearil (A) y POLE (B)

Esto es debido a la competencia existente entre la fibra y el surfactante, por lo que se eliminó la adición de sal en la extracción MAME-SPME.

También se estudió la adición de otro tipo de sales, como el KNO_3 y Na_2SO_4 , con resultados similares.

7.2.2. Parámetros analíticos y validación

Análisis Cromatográfico

El análisis de las muestras extraídas en MAME-SPME se realizó, de la misma manera que para MAME, usando un sistema HPLC-UV.

La separación y determinación de los compuestos bajo estudio se llevó a cabo inyectando $50 \mu\text{l}$ de extracto en el cromatógrafo líquido y se midió la absorbancia de cada analito a la longitud de onda optimizada para cada uno de ellos (Tabla A.1, apartado A.2).

El cromatograma obtenido para la mezcla de seis pesticidas, utilizando POLE como extractante y la fibra de $60 \mu\text{m}$ PDMS-DVB, se muestra en la Figura 7.13.

Se puede observar que aunque la señal de los compuestos no es tan intensa comparada con la que se obtiene cuando se realiza la inyección del extracto MAME directamente, la línea base en este caso sí es bastante plana, y por tanto, se han conseguido eliminar las interferencias producidas por el resto de sustancias presentes en el suelo.

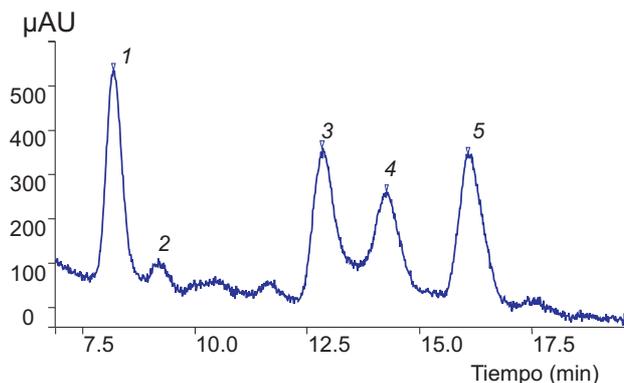


Figura 7.13: Cromatograma del extracto de suelo de Valleseco I tras aplicar MAME-SPME

Parámetros Analíticos

Para determinar la precisión del método de extracción propuesto, se realizó el estudio de los parámetros analíticos del mismo con seis muestras de suelo de Valleseco I.

Las muestras se acondicionaron con la mezcla de pesticidas organoclorados, de manera que la concentración final de cada uno de ellos fuese la misma que la utilizada en el proceso de optimización ($0.8 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para el 4,4'-DDD, 4,4'-DDT, 2,4'-DDT y 4,4'-DDE y $1.6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para el Aldrín y Dieldrín). Estas muestras fueron sometidas al proceso completo MAME-SPME, con los dos surfactantes estudiados, y a la posterior separación y determinación por HPLC-UV.

A estas muestras se les calcularon las desviaciones estándar relativas para todos los compuestos con cada uno de los surfactantes, así como los límites de detección (Tabla 7.7).

Los límites de detección se calcularon como tres veces la concentración correspondiente a la señal del ruido para cada pesticida [142], y varían entre 36 y 164 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ para todos los compuestos estudiados. Estos valores son muy inferiores a los obtenidos al inyectar directamente el extracto MAME (hasta 800 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$, ver Tabla 7.3).

Esta disminución en los límites de detección permitirá la determinación de concentraciones de pesticidas organoclorados en suelos, menores que las que permite la extracción MAME aplicada directamente, con lo cual aumenta la aplicabilidad del método MAME-SPME.

Analito	Mezcla Stearil		POLE	
	RSD (%)	LOD ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$)	RSD (%)	LOD ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$)
4,4'-DDD	5.3	64	7.4	68
Dieldrín	9.5	124	5.5	96
4,4'-DDT	9.7	44	7.3	72
2,4'-DDT	9.6	100	8.4	84
4,4'-DDE	6.4	36	7.9	56
Aldrín	10.1	164	-	-

Tabla 7.7: Valores de desviación estándar relativa (RSD) y límites de detección obtenidos (LOD) tras aplicar MAME-SPME

Validación del método con una muestra de suelo certificada

Tal y como se hizo para la extracción MAME, el método fue validado con una muestra certificada. La muestra utilizada fue la misma que en el caso anterior (CRM804-050), conteniendo cuatro de los pesticidas estudiados.

En la Tabla 7.8 se muestran los pesticidas presentes en la muestra certificada, los valores de concentración medios certificados y los intervalos de confianza para cada uno de los compuestos (las desviaciones estándar relativas se muestran en la Tabla 7.4), así como las concentraciones obtenidas de los pesticidas al aplicar MAME-SPME a dicho material certificado con cada uno de los surfactantes estudiados, junto con la desviación estándar de cada valor.

Se utilizaron 2 gramos de muestra y se les aplicó las condiciones optimizadas de potencia y tiempo para cada surfactante.

Compuesto	Datos Certificados		Conc. Encontrada ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	
	Valor Refer.	Int.Confianza	Mezcla	
	($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Stearil	POLE
4,4'-DDD	1.531	1.294-1.767	1.576 \pm 0.101	1.637 \pm 0.046
Dieldrín	1.863	1.539-2.186	2.195 \pm 0.114	1.741 \pm 0.038
4,4'-DDT	1.060	0.926-1.195	0.972 \pm 0.095	1.082 \pm 0.051
4,4'-DDE	1.520	1.325-1.715	1.410 \pm 0.171	1.774 \pm 0.044

Tabla 7.8: Validación del método MAME-SPME usando un material certificado

Como se puede observar, las concentraciones obtenidas están, para los dos surfactantes, dentro del intervalo de confianza esperado, indicando que el procedimiento de extracción y determinación propuesto es válido para este tipo de matriz.

7.2.3. Aplicación de MAME-SPME a muestras de suelos

Tras optimizar los factores de los que depende el método de extracción MAME-SPME y validar el método con una muestra certificada, diferentes muestras de suelos fueron sometidas a las condiciones óptimas para cada surfactante. Estos suelos proceden de diferentes zonas de la isla de Gran Canaria y presentan características diferentes: tamaño de grano, porcentaje de materia orgánica, conductividad y pH, descritas previamente en la Tabla 6.1 (apartado 6.8). Las muestras fueron previamente acondicionadas, tal y como se explica en el apartado 6.2, con la mezcla de seis pesticidas organoclorados. El suelo procedente de San Roque utilizado en la extracción MAME no se incluyó por interferencias de la matriz con la fibra.

Las recuperaciones obtenidas para los suelos estudiados con los dos surfactantes utilizados (mezcla stearyl y POLE) se muestran en la Figura 7.14. En dicha figura se puede observar que, en general, las recuperaciones utilizando el método MAME-SPME, son buenas para los dos surfactantes.

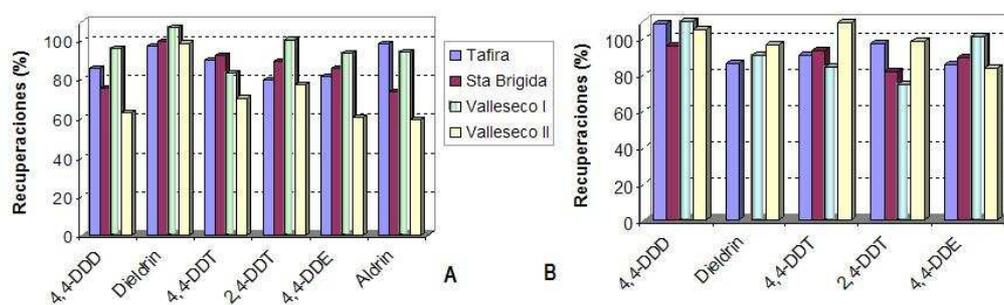


Figura 7.14: Recuperaciones obtenidas en los distintos suelos utilizando mezcla stearyl (A) y POLE (B)

7.3. Optimización de la extracción MAME en fangos

El amplio uso en el pasado de los pesticidas organoclorados y su altísima persistencia, conlleva a que continúen presentes en la mayor parte de las regiones agrícolas. Este hecho unido a la lixiviación de los suelos por lluvias y escorrentías, transportándolos a través de ríos y barrancos, hace que los pesticidas organoclorados lleguen a sedimentos y fangos, pudiéndose encontrar en zonas muy alejadas a los lugares de aplicación.

7.3.1. Optimización de las variables

Se realizó la extracción de los seis pesticidas organoclorados de interés en fangos de escorrentías, recogidos en diferentes desembocaduras de barrancos alrededor de la isla de Gran Canaria (ver mapa: Figura 6.1, apartado 6.2). Se estudiaron los fangos de seis zonas diferentes de la isla: Maspalomas, Cicer, La Aldea, Sardina, Taurito, Hoya Pozuelo, con características físico-químicas distintas (Tabla 6.2, apartado 6.8).

El surfactante utilizado en este estudio fue el POLE, con el que se obtuvieron los mejores resultados en suelos, tanto para MAME como en el acoplamiento MAME-SPME.

Los parámetros a optimizar son la potencia y tiempo de irradiación microondas. La concentración y volumen de surfactante se fijaron como constantes y se tomaron los valores optimizados para los suelos (5 %,v/v – 8 ml).

La optimización de los factores antes señalados se llevó a cabo con fango de Hoya Pozuelo (Gran Canaria). Se utilizaron 2 g de fango con un tamaño de grano

inferior a 0.30 mm. Para la optimización de las variables se utilizó un diseño experimental de tipo factorial 3^2 , siendo 3 el número de valores que toma cada variable y 2 el número de variables [138]. El diseño experimental estudiado consistió en un diseño de 10 muestras, tomando para la variable potencia los valores 500, 750 y 1000 W y para la variable tiempo los valores de 2, 8 y 14 min; con el que se obtuvo una superficie de respuesta con la cual poder calcular el valor óptimo de cada variable.

La Figura 7.15 muestra la superficie de respuesta para la potencia y tiempo utilizando POLE para el analito 4,4'-DDT, aunque todos presentan una tendencia similar.

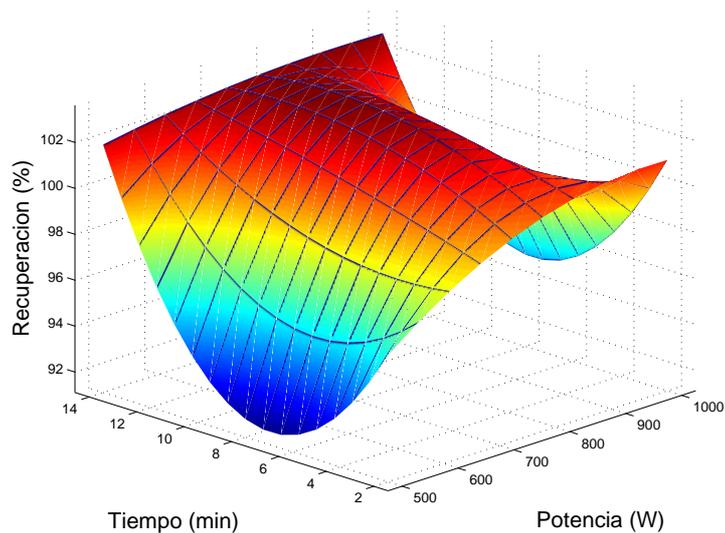


Figura 7.15: Superficie de respuesta potencia-tiempo para el 4,4'-DDT

Como se puede observar, de dicha figura se deduce que los valores óptimos son: 750 W y 8 minutos. Para el resto de los compuestos los resultados fueron similares.

7.4. Optimización de MAME-SPME en fangos

La optimización de los parámetros que afectan al proceso de extracción MAME-SPME en fangos, se realizó de manera similar al aplicado para suelos. Los parámetros a optimizar son: tiempo de absorción y tiempo de desorción. Las variables temperatura y adición de sal no fueron estudiadas, así como el tipo de fibra, ya que al utilizar el mismo surfactante para los mismos compuestos se pueden fijar las condiciones optimizadas anteriormente (fibra SPME 60 μm PDMS-DVB, temperatura ambiente y sin adición de sal).

Para intentar mejorar el proceso, se incluyeron además una serie de parámetros nuevos, como la composición y el volumen del vial de SPME; se optimizó la dilución del extracto MAME y el volumen final del mismo. Además se estudió el efecto que produce la vibración en la desorción y el volumen de desorción que produzcan una mejor preconcentración con resultados reproducibles.

7.4.1. Optimización de las variables en SPME

Estudio de la composición del vial

En la extracción MAME-SPME en suelos se utilizó un vial de SPME de 4 ml con 2 ml de extracto MAME y 2 ml de agua bidestilada (50 % extracto MAME). Pero se pueden utilizar viales de volúmenes mayores que permitan una mayor preconcentración de los analitos en la fibra, y por tanto, obtener áreas de pico mayores y por tanto, menores límites de detección. Para estudiar este efecto se utilizaron viales de SPME de 15 ml.

Una alta concentración de surfactante puede afectar negativamente a la extracción SPME por la competencia que se establece con la fibra, así que se comprobó cómo afectaban los distintos porcentajes de dilución del extracto MAME en el proceso de microextracción. Se estudiaron los siguientes porcentajes en volumen de extracto MAME (el resto, hasta 100 % se diluyó con agua bidestilada en 15 ml): 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 75 %, 100 % (v/v) (extracto MAME puro).

Las condiciones de SPME seleccionadas inicialmente para este estudio fueron: 40 min de absorción y 6 min de tiempo de desorción, volumen de desorción de 80 μ l de metanol de los cuales se inyectaron en el sistema cromatográfico 50 μ l.

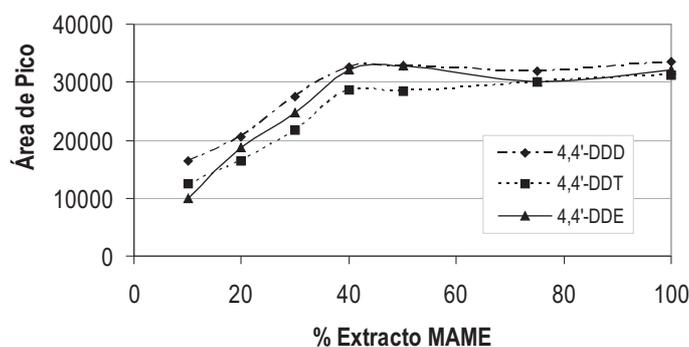


Figura 7.16: Influencia de los porcentajes de extracto MAME estudiados (v/v)

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 7.16. A partir de un porcentaje del 40 % de extracto MAME el área de pico prácticamente no varía, indicando que a pesar de que la cantidad de analitos presentes sea mayor (mayor cantidad de extracto MAME), la competencia entre la fibra y el surfactante hace que el área de pico no aumente.

Por tanto tomamos este valor como el óptimo: 40 % (v/v) extracto MAME y fijamos el volumen de dicho extracto en 5 ml. Este valor ha sido seleccionado experimentalmente, ya que el volumen añadido de surfactante es 8 ml y tras la absorción producida por la matriz, el surfactante extraído no suele superar los 6 ml. Por tanto para realizar la optimización del proceso MAME-SPME en fangos tomaremos 5 ml de extracto MAME y 7.5 ml de agua bidestilada, correspondiente al porcentaje seleccionado (40 %, v/v).

Optimización del tiempo de absorción y desorción

Al cambiar la composición y el volumen del vial de SPME utilizado, a pesar de que se analizan los mismos compuestos que en suelos (6 pesticidas organoclorados), utilizando igualmente POLE como extractante, los valores óptimos de tiempo de absorción y tiempo de desorción pueden cambiar.

En la Figura 7.17 se representan los resultados obtenidos en la optimización de dichas variables (tiempo de absorción y tiempo de desorción).

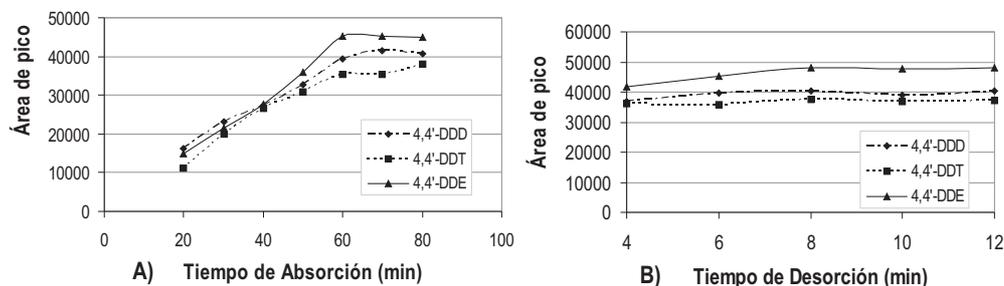


Figura 7.17: Optimización del tiempo de absorción (A) y desorción (B)

Como se puede observar en dicha figura, y tal y como cabría esperar, el tiempo de absorción óptimo es de 60 min, algo superior al optimizado para suelos (40 min),

debido al aumento en el volumen del vial, que provoca que el equilibrio tarde más tiempo en producirse. El tiempo de desorción prácticamente no afecta a las áreas de pico obtenidas, indicando que la transferencia de analitos de la fibra al metanol es prácticamente inmediata hasta llegar a la condición de equilibrio. Para asegurarnos una buena reproducibilidad se eligió 8 min como tiempo óptimo de desorción.

Estudio de la agitación en la desorción y volumen de desorción

Otros parámetros que pueden afectar en el proceso SPME son la agitación en la desorción y el volumen en el que se realiza la desorción. Al agitar el vial de desorción incrementa la transferencia de masa entre la fibra y el metanol por convección, provocando que el equilibrio pueda llegar a ser más eficiente al aumentar la difusión de los analitos desde la fibra hacia la disolución de metanol.

Para estudiar el efecto de la agitación en la desorción, la fibra metálica de SPME se aplicó sobre un agitador magnético a diferentes velocidades (700, 1100 y 1800 rpm). Se encontró que agitaciones intermedias (1100 rpm en el agitador magnético) producen las mayores áreas de pico para los pesticidas organoclorados estudiados.

La Figura 7.18.A muestra los resultados obtenidos para los seis pesticidas. Elegimos 1100 rpm en el agitador magnético como valor óptimo para llevar a cabo la desorción.

Con estas nuevas condiciones se estudió el volumen de desorción. A lo largo de toda la optimización se utilizó un volumen de 80 μ l para la desorción de los analitos. Sin embargo, volúmenes inferiores conducirían a una mayor preconcentración, y por tanto, un incremento en el área de pico. Se estudiaron cuatro volúmenes

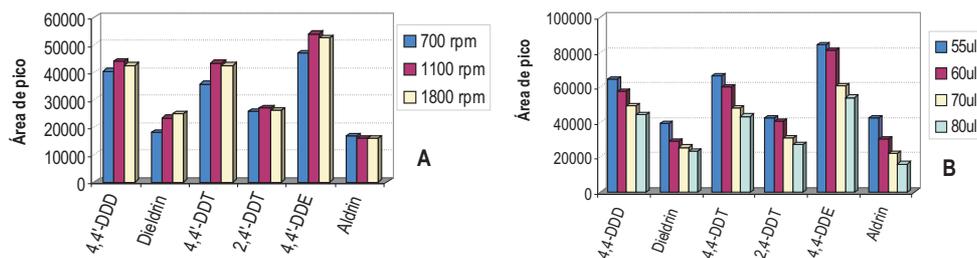


Figura 7.18: Optimización de la agitación en la desorción (A) y el volumen de desorción (B)

diferentes (ver Figura 7.18.B), donde se puede observar, como era de esperar, que el área de pico aumenta a medida que disminuye el volumen de desorción para todos los analitos estudiados. De acuerdo con los resultados, se eligió un volumen de desorción de 55 μl de metanol, de los cuales se inyectaron en el cromatógrafo 50 μl .

7.4.2. Parámetros analíticos y validación

Análisis Cromatográfico

El análisis de las muestras extraídas se realizó usando un cromatógrafo líquido de alta resolución con detección ultravioleta-visible [130].

El cromatograma obtenido para la mezcla de los seis pesticidas utilizando POLE como extractante acoplado a una fibra de SPME 60 μm PDMS-DVB, se muestra en la Figura 7.19. En éste se observa que la separación entre picos es suficiente para cuantificar satisfactoriamente los diferentes analitos. Con el método de extracción MAME-SPME optimizado se obtienen picos más definidos e intensos que si se inyectase directamente el extracto MAME. Además, se elimina la señal producida por el surfactante, obteniendo una mejor línea base.

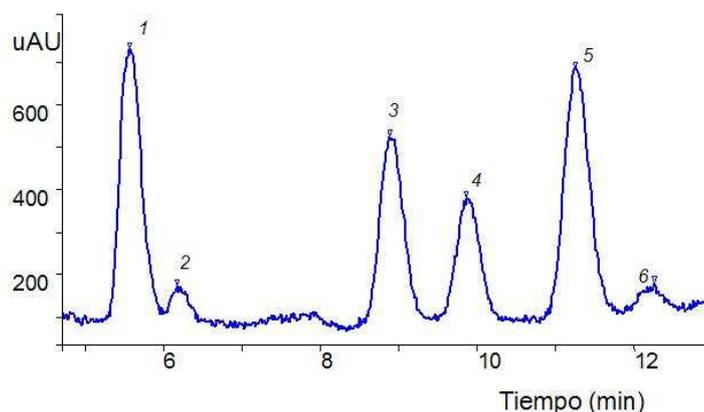


Figura 7.19: Cromatograma del extracto de fango de Hoya Pozuelo utilizando MAME-SPME

Parámetros Analíticos

Para determinar la precisión del método de extracción y determinación propuesto, se realizó el estudio de los parámetros analíticos del mismo con seis muestras de fango de Hoya Pozuelo. Las muestras se acondicionaron con la mezcla de pesticidas organoclorados, de manera que la concentración final de cada uno de ellos fuese la misma que la utilizada en el proceso de optimización ($0.8 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para el 4,4'-DDD, 4,4'-DDT, 2,4'-DDT y 4,4'-DDE y $1.6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para el Aldrín y Dieldrín).

Estas muestras fueron sometidas al proceso completo MAME-SPME y a la posterior separación y determinación por HPLC-UV. A estas muestras se les calcularon las recuperaciones obtenidas, las desviaciones estándar relativas y los límites de detección para todos los compuestos (Tabla 7.9). Los límites de detección se calcularon como tres veces la concentración correspondiente a la señal del ruido

para cada pesticida [142], y varían entre $28 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ y $136 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ para todos los compuestos estudiados, siendo las desviaciones inferiores al 5 % excepto para el Aldrín y Dieldrín.

Analito	Recuperación (%)	RSD (%) ^a	LOD ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$) ^b
4,4'-DDD	104.5	2.4	44
Dieldrín	91.1	8.4	104
4,4'-DDT	108.3	3.8	40
2,4'-DDT	98.1	2.7	84
4,4'-DDE	105.7	4.3	28
Aldrín	98.9	10.1	136

a): Desviación estándar relativa

b): Límite de Detección

Tabla 7.9: Valores de recuperación), desviación estándar relativa y límites de detección obtenidos tras aplicar MAME-SPME

Validación del método con una muestra certificada

Tal y como se hizo para la extracción MAME-SPME en suelos, el método fue validado con una muestra certificada. La muestra utilizada fue la misma que en el caso anterior, CRM804-050 (por su carácter arenoso), conteniendo cuatro de los pesticidas estudiados.

En la Tabla 7.10 se muestran los pesticidas presentes en la muestra certificada, los valores de concentración medios certificados, las desviaciones estándar relativas, los intervalos de confianza para cada uno de los compuestos, así como las concentraciones obtenidas de los pesticidas al aplicar MAME-SPME al material

certificado, junto con el valor de desviación estándar de cada valor. Se utilizaron 2 gramos de muestra y se les aplicó las condiciones optimizadas de potencia y tiempo así como las condiciones óptimas para la extracción MAME-SPME. Como se puede observar, las concentraciones obtenidas están dentro del intervalo de confianza esperado, indicando que el procedimiento de extracción y determinación propuesto es válido para este tipo de matriz.

Compuesto	Valor Refer. ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	SD^a ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Int.Confianza ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Conc. Encontrada ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
4,4'-DDD	1.531	0.476	1.294-1.767	1.333±0.052
Dieldrín	1.863	0.655	1.539-2.186	2.112±0.119
4,4'-DDT	1.060	0.275	0.926-1.195	0.933±0.028
4,4'-DDE	1.520	0.410	1.325-1.715	1.396±0.167

a): Desviación estándar

Tabla 7.10: Extracción de pesticidas usando MAME-SPME del material certificado CRM804-050

7.4.3. Aplicación de MAME-SPME a muestras de fangos

Aplicación de MAME-SPME a muestras frescas

Tras optimizar los factores de los que depende el método de extracción MAME-SPME y validar el método con una muestra certificada, diferentes muestras de fangos fueron sometidas a las condiciones óptimas. Estos fangos proceden de las escorrentías de diferentes desembocaduras de barrancos de la isla de Gran Canaria y presentan características diferentes: tamaño de grano, porcentaje de materia

orgánica, conductividad y pH, descritas previamente en la Tabla 6.2 en el apartado 6.8. Las muestras fueron previamente acondicionadas, tal y como se explica en el apartado 6.2, con la mezcla de seis pesticidas organoclorados.

Las recuperaciones obtenidas para los fangos estudiados se muestran en la Figura 7.20. En dicha figura se puede observar que las recuperaciones obtenidas utilizando el método MAME-SPME son muy satisfactorias. Por lo que este método puede ser utilizado para la determinación de pesticidas organoclorados en muestras de fangos.

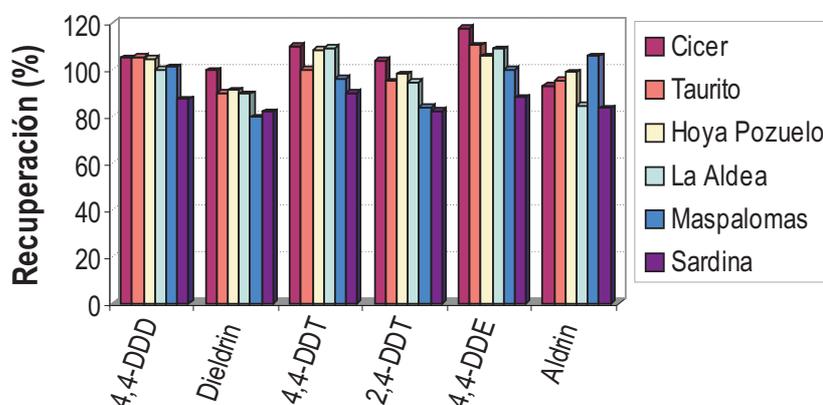


Figura 7.20: Recuperaciones obtenidas con MAME-SPME para distintos fangos

Aplicación de MAME-SPME a muestras envejecidas

A medida que aumenta el tiempo en que los analitos están en contacto con la muestra, se incrementan tanto los procesos de adsorción, como los de absorción o secuestración, dificultando su extracción y por tanto su determinación.

Para estudiar la influencia del envejecimiento de las muestras en la extracción, se aplicó el método MAME-SPME optimizado a distintos períodos de tiempo, hasta 1 mes después de ser acondicionadas.

En la Figura 7.21 se muestran las recuperaciones obtenidas para el fango de Hoya Pozuelo a las 24 horas (muestra fresca), 1 semana, 2 semanas y 1 mes después de su acondicionamiento.

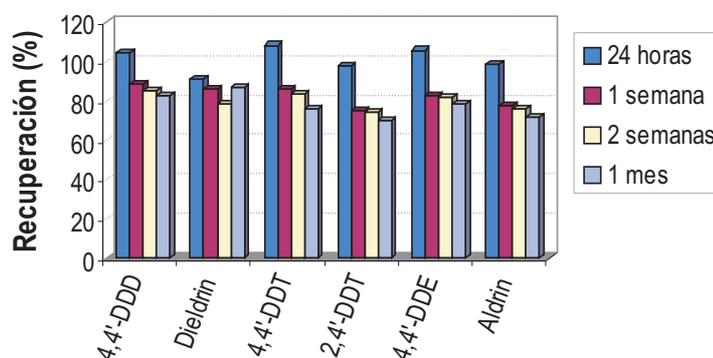


Figura 7.21: Recuperación obtenida para distintos tiempos de envejecimiento

Los resultados obtenidos con el estudio de envejecimiento de las muestras indican que, tal y como se esperaba, las recuperaciones disminuyen con el tiempo para todos los compuestos, lo cual se puede explicar por procesos de absorción. En la mayor parte de los casos estos procesos prácticamente se estabilizan a la semana. Además, ninguno de los metabolitos del DDT incrementó con el tiempo, lo que permite asegurar que no están ocurriendo procesos de degradación en el mes que duró el estudio.

Estos resultados indican que el método desarrollado permite determinar la presencia de pesticidas en muestras reales y muestran la viabilidad del método como alternativa a los métodos convencionales.

Extracción y Determinación en Muestras Biológicas

Los pesticidas utilizados para el control de plagas tienen como destino último los sistemas acuáticos, debido al transporte atmosférico y a la lixiviación de los suelos por lluvias, que son arrastrados finalmente hasta el mar a través de los ríos y barrancos [158, 159]. Este hecho, unido a la altísima persistencia de los pesticidas organoclorados y a su hidrofobicidad, facilita la absorción de los mismos en la materia orgánica. Una vez en el mar los pesticidas tenderán a depositarse en el sistema bentónico, o a asociarse a la materia orgánica en suspensión. En el primer caso entrarán en la cadena alimentaria por su incorporación al sustrato, pudiendo ser asimilados por vegetales (incluidas las algas [160]) o animales. En el segundo caso, lo más probable es que sean asimilados por organismos filtradores (como los moluscos [161]). Por ello y por su alta toxicidad, hay un interés creciente en la optimización de nuevas metodologías analíticas que permitan la determinación de estos compuestos en distintas matrices, como algas y moluscos, de una manera rápida, económica y menos contaminante, como puede ser la extracción MAME.

8.1. Optimización y aplicación de MAME en algas

8.1.1. Optimización de variables en la extracción MAME

De la misma forma que para suelos y fangos, se optimizaron las variables para la extracción micelar asistida por microondas utilizando diseños factoriales, los cuales permiten variar simultáneamente los factores a la vez que se estudian sus efectos [138]. Las variables estudiadas fueron: concentración de surfactante, potencia y tiempo de microondas.

El volumen de surfactante se fijó en 10 ml. No se tomó el valor utilizado para suelos y fangos (8 ml) debido a la alta absorción de la disolución de surfactante producida por las matrices biológicas. Al ser matrices llevadas a sequedad, tanto las algas como los moluscos, al ponerlas en contacto con disoluciones acuosas se hidratan, disminuyendo por tanto el volumen que puede ser recuperado en el extracto.

El estudio de los factores antes señalados se llevó a cabo con el alga *Ulva rigida*. Se utilizaron 0.5 g de alga seca y troceada con un tamaño (área) de muestra de aproximadamente 25 mm². Para la optimización de todas las variables se utilizó un diseño experimental de tipo factorial en varias fases [80]. La primera fase consistió en un diseño factorial 2³ (siendo 3 el número de variables a optimizar), el cual permite obtener la influencia que tiene cada variable en la recuperación y las posibles interacciones existentes entre ellas.

Con este diseño se toma el valor máximo y mínimo de cada variable: Potencia- 100 y 800 W, Tiempo- 2 y 14 min y Concentración de Surfactante- 1 y 5 % (v/v).

Combinando los valores dados de dichos parámetros entre sí, se obtiene un total de 8 posibles ensayos (Tabla 8.1).

El diseño se realizó de tal forma que las muestras se analizaron de manera aleatoria para evitar la influencia de variables ocultas. En todos los casos las muestras se estudiaron por duplicado.

Con este diseño lo que se obtiene es una tabla de correlaciones, que varían entre -1 y 1 , siendo ambas las correlaciones máximas negativa y positiva respectivamente, y 0 la correlación mínima. En esta tabla se observan las correlaciones de cada variable con la recuperación (correlación parcial) y las correlaciones de las variables entre sí (correlación bivariada).

	4,4'-DDD	Dieldrin	4,4'-DDT	2,4'-DDT	4,4'-DDE	Aldrin
POTENCIA	0.172	-0.275	-0.502	-0.353	0.034	0.349
TIEMPO	0.258	0.065	-0.261	-0.216	0.299	0.393
CON.SURF	0.709	0.739	0.368	0.003	0.849	0.144
PT X CON	-0.175	0.314	0.230	0.001	-0.055	-0.054
TP X CON	-0.268	-0.071	0.107	0.001	-0.503	-0.062
PT X TP	-0.047	0.019	-0.157	-0.083	-0.011	-0.159

Tabla 8.1: Correlaciones entre variables

Los resultados indicaron que la variable que más influye en la recuperación para la mayoría de los compuestos, es la concentración de surfactante, y las variables más relacionadas entre sí son la potencia y la concentración en la mayor parte de los casos (ver Tabla 8.1).

Concentración de Surfactante

La eficiencia del proceso MAME para extraer los analitos presentes en las muestras de algas dependerá, entre otros factores, de la concentración de surfactante presente.

En el diseño experimental inicial se obtuvo que la variable que más influencia tiene en la recuperación es la concentración de surfactante, y que a su vez, esta variable está relacionada con la potencia del microondas (ver Tabla 8.1). Por tanto, para obtener el valor de concentración óptima de surfactante será conveniente aplicar un diseño factorial 3^2 con duplicado en el punto central [54], donde 2 es el número de variables; en este caso representa la concentración y la potencia.

Este diseño experimental permite obtener una superficie de respuesta entre ambas variables, combinando tres valores de la variable Potencia (100, 450 y 800 W) con tres valores de la Concentración de Surfactante (1, 3 y 5 %, v/v). Teniendo en cuenta que se realiza un duplicado del punto central, se trata de un diseño de 10 muestras. Con la superficie de respuesta obtenida se puede calcular el máximo de la variable para cada compuesto estudiado.

La Figura 8.1 muestra los porcentajes de recuperación obtenidos para concentraciones de surfactantes comprendidas entre 1 y 5 % (v/v) y potencias entre 100 y 800 W. En la gráfica se ha representado el analito 4,4'-DDT, pero todos presentan una tendencia similar. De ella se deduce que la concentración óptima de surfactante es 5 % (v/v).

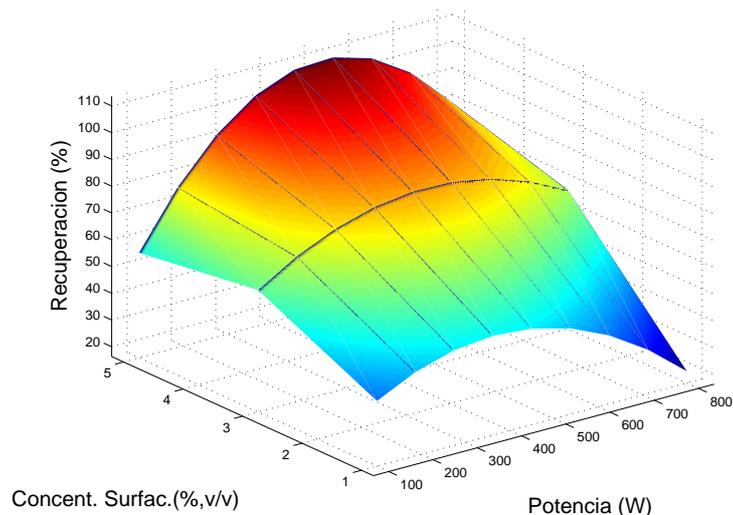


Figura 8.1: Superficie de respuesta potencia-concentración para el 4,4'-DDT

No se utilizaron concentraciones mayores de surfactante ($>5\%$, v/v), porque se comprobó experimentalmente que por encima de este valor, la viscosidad del extractante aumenta y debido a esto, la eficiencia de extracción disminuye.

Potencia y Tiempo de irradiación

A pesar de que en el diseño experimental inicial no se observa una alta relación entre las variables potencia y tiempo, debido a la influencia que producen ambos factores en la temperatura (variable secundaria), se consideró adecuado incluirlas a ambas en un diseño factorial 3^2 de tal forma que pudiésemos optimizar ambas variables conjuntamente.

Este diseño experimental permite obtener una superficie de respuesta entre ambas variables, combinando tres valores de la variable Potencia (100, 300 y 500 W) con tres valores de la variable Tiempo (2, 8 y 14 min).

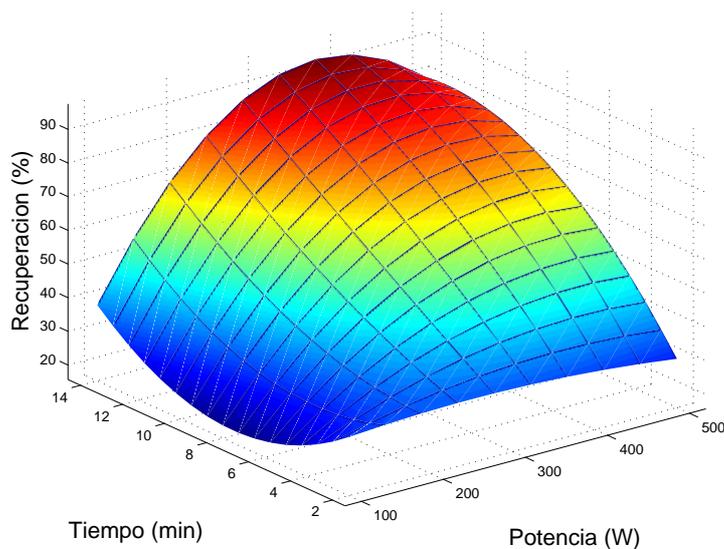


Figura 8.2: Superficie de respuesta potencia-tiempo para el 4,4'-DDT

Se tomaron potencias inferiores a las utilizadas con otras matrices porque se observó experimentalmente que a potencias mayores se producía la degradación del alga, complicando las extracciones, y potencias inferiores a 500 W eran suficientes para realizar una extracción eficiente.

Teniendo en cuenta que se realiza un duplicado del punto central, se trata de un diseño de 10 muestras. Con la superficie de respuesta obtenida se puede calcular el máximo de ambas variables para cada compuesto estudiado.

La Figura 8.2 muestra los valores óptimos de potencia y tiempo para el 4,4'-DDT, pero todos los analitos presentan una tendencia similar.

La potencia y tiempo óptimos obtenidos para la extracción MAME en muestras de algas fue de 300 W y 14 minutos respectivamente.

8.2. Optimización de MAME-SPME en algas

Con objeto de mejorar la determinación de los analitos y conseguir una mayor limpieza del extracto MAME, se acopló un segundo paso en el proceso, mediante la microextracción en fase sólida. Para llevar a cabo la extracción MAME-SPME de los pesticidas organoclorados estudiados en algas, se utilizó el mismo par surfactante-fibra optimizado para fangos en un estudio previo: POLE – fibra PDMS-DVB 60 μm .

Muchos de los parámetros de interés ya fueron optimizados previamente en dicho estudio (apartado 7.4). La mejor eficiencia de extracción se obtuvo usando un 40 % (v/v) de extracto MAME con 60 % (v/v) de agua bidestilada. Concretamente se añadió en un vial de SPME de 15 ml, 5 ml de extracto MAME y 7.5 ml de agua.

Respecto a la temperatura y la adición de sal, se observó que un incremento de estos parámetros provocan una disminución en la recuperación de los analitos de interés (ver Figuras 7.11 y 7.12, apartado 7.2.1) [162], por lo que se realizaron las extracciones a temperatura ambiente y sin adición de sal.

Asimismo, se mantuvieron constantes los parámetros optimizados para el proceso de desorción: agitación en la desorción, volumen de desorción (ver Figura 7.18, apartado 7.4.1) y volumen inyectado en el sistema HPLC. El tiempo de desorción sí será optimizado nuevamente para estudiar de que manera le afectan estos parámetros.

Los valores fijados para el proceso de desorción fueron:

- *Agitación en la desorción:* Agitación media (1100 rpm, influencia indirecta)

- *Volumen de Desorción:* 55 μl
- *Volumen inyectado en HPLC:* 50 μl

La optimización del resto de parámetros que afectan al proceso de extracción MAME-SPME en algas, se realizó de manera similar al aplicado en otras matrices. Los parámetros a optimizar son el tiempo de absorción y tiempo de desorción, manteniendo el resto de variables fijas en su valor óptimo.

8.2.1. Optimización del tiempo de absorción y desorción

Una vez optimizadas todas las condiciones que pueden afectar al proceso de absorción y desorción en SPME (temperatura, sal, agitación, volumen de desorción, etc.), se hace necesario repetir el estudio del tiempo al cual se produce el equilibrio entre la disolución a extraer y la fibra (absorción), y el tiempo de equilibrio entre la fibra y el desorbente (desorción), ya que estos equilibrios variarán al cambiar dichos parámetros.

En la Figura 8.3 se representan los resultados obtenidos en la optimización del tiempo de absorción (A) y tiempo de desorción (B) para tres de los pesticidas estudiados, a modo de ejemplo.

Como se puede observar la cantidad extraída de los tres compuestos (representada como área de pico) incrementa hasta los 60 minutos; la extracción no aumenta significativamente para tiempos mayores. El valor óptimo de absorción, tal y como cabría esperar, corresponde al obtenido para fangos, ya que los parámetros incluidos por último en el estudio no afectan al proceso de absorción, sino al de desorción.

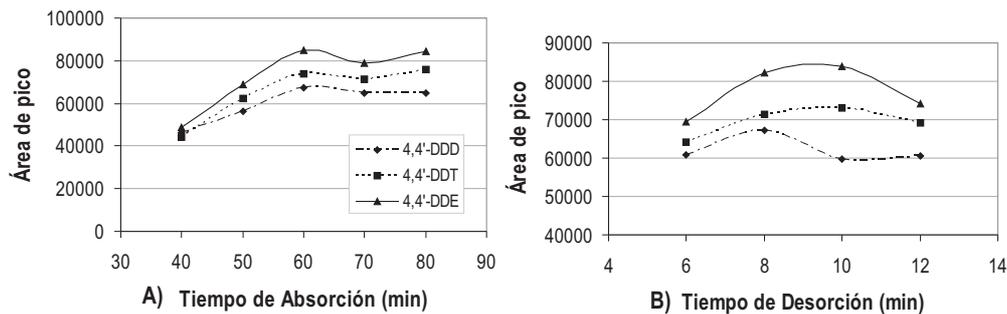


Figura 8.3: Optimización del tiempo de absorción (A) y desorción (B)

El tiempo de desorción se estudió entre 6 y 12 minutos, en relación al rango de valores obtenidos anteriormente. En la Figura 8.3.B se observa que el tiempo óptimo de desorción es de 10 minutos, algo superior al obtenidos para fangos (8 min).

Finalmente, teniendo en cuenta estos resultados, los parámetros óptimos de extracción para los compuestos estudiados en POLE fueron: 60 min de tiempo de absorción a temperatura ambiente y 10 min de desorción con agitación.

8.2.2. Parámetros analíticos

Para determinar la precisión del método de extracción MAME-SPME en algas, se realizó el estudio de los parámetros analíticos del mismo con seis muestras de alga *Ulva rigida*.

Las muestras se acondicionaron con la mezcla de pesticidas organoclorados, de manera que la concentración final de cada uno de ellos fuese la misma que la utilizada en el proceso de optimización ($4 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para el 4,4'-DDD, 4,4'-DDT, 2,4'-DDT y 4,4'-DDE y $8 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para el Aldrín y Dieldrín).

Estas muestras fueron sometidas al proceso completo MAME-SPME y a la posterior separación y determinación por HPLC-UV.

A estas muestras se les calcularon las recuperaciones obtenidas, las desviaciones estándar relativas y los límites de detección para todos los compuestos (Tabla 8.2). Los límites de detección se calcularon como tres veces la concentración correspondiente a la señal del ruido para cada pesticida [142], y varían entre $138 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ y $348 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ para todos los compuestos estudiados, estando las desviaciones estándar por debajo del 10 % en todos los casos.

Los porcentajes de recuperación fueron siempre superiores al 87 %, lo que indica la viabilidad de este método para la determinación de los pesticidas organoclorados en este tipo de muestras.

Analito	Recuperación (%)	RSD (%)^a	LOD ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$)^b
4,4'-DDD	89.6	8.4	148
Dieldrín	101.1	9.6	322
4,4'-DDT	91.5	6.9	164
2,4'-DDT	93.8	7.9	174
4,4'-DDE	90.2	8.9	138
Aldrín	87.4	10.3	348

a): Desviación estándar relativa

b): Límite de Detección

Tabla 8.2: Valores de recuperación, desviación estándar relativa y límites de detección obtenidos tras aplicar MAME-SPME

8.2.3. Aplicación de MAME-SPME a muestras de algas

Tras optimizar los factores de los que depende el método de extracción MAME-SPME, diferentes tipos de algas fueron sometidas a las condiciones optimizadas para determinar la mezcla de pesticidas estudiados en las mismas.

Las algas estudiadas fueron: *Ulva rigida*, *Valonia utricularis*, *Coralina elongata*, *Solieria filiformis* y *Gracilaria cornea*.

Éstas proceden de cultivos de algas de la isla de Gran Canaria. Las muestras fueron previamente acondicionadas, tal y como se explica en el apartado 6.2.

Las recuperaciones obtenidas para las algas estudiadas se muestran en la Figura 8.4. En la misma se puede observar que las recuperaciones que se obtuvieron utilizando el método MAME-SPME no varían significativamente dependiendo del tipo de alga. En todos los casos las recuperaciones obtenidas son superiores al 80 %, lo que demuestra la aplicabilidad del método desarrollado.

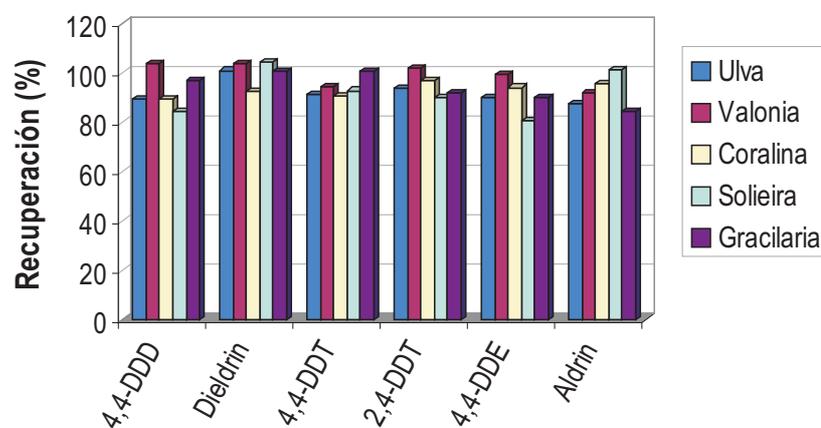


Figura 8.4: Recuperaciones obtenidas con MAME-SPME para distintas algas

8.3. Optimización de MAME-SPE en algas

Junto con la microextracción en fase sólida la extracción en fase sólida (SPE) es otro de los procesos que se utilizan como paso de limpieza y preconcentración en la cuantificación de analitos.

La SPE se basa en la retención selectiva de compuestos de interés en un adsorbente sólido y posteriormente ser eluidos con un disolvente orgánico [46].

Hay diferentes parámetros que pueden influir en el proceso de SPE, como son:

- Tipo de adsorbente sólido
- Volumen de absorción y dilución de la muestra
- Composición y volumen de la disolución de lavado
- Tipo y volumen de disolución desorbente

Por ello, estas variables hay que optimizarlas en función del analito y la matriz en estudio.

8.3.1. Optimización de las variables en SPE

Tipo de adsorbente sólido

Al optimizar un método con SPE es necesario elegir aquel cartucho con el que se obtengan las mejores eficiencias de extracción [47]. Existen diferentes tipos de adsorbentes sólidos comerciales que varían en función de las características físico-químicas de los compuestos a extraer, incrementando con ello la selectividad del método [123].

Por ello, para optimizar el proceso MAME-SPE, comparamos los resultados obtenidos al extraer los pesticidas organoclorados objeto de estudio con diferentes cartuchos SPE, con el fin de elegir aquel con el que se obtengan las mayores recuperaciones (dadas como áreas de pico).

Las condiciones seleccionadas para llevar a cabo este estudio fueron 5 ml de extracto MAME diluido con agua bidestilada hasta un volumen de 25 ml para el proceso de absorción, y 5 ml de metanol para el proceso de desorción.

Los cartuchos SPE estudiados fueron: Envirelut-Pesticide 500mg, Bond Elut-ENV 500 mg, Mega BE-FL 1 g, Sep-Pak Vac C₁₈ 500 mg y Oasis HLB 200 mg.

Los resultados obtenidos para los diferentes cartuchos se muestran en la Figura 8.5, donde se puede observar que los mejores resultados se obtuvieron para el adsorbente C₁₈ y Envirelut-Pesticide. Sin embargo, se eligió este último porque era el que daba una mejor línea base en la determinación cromatográfica.

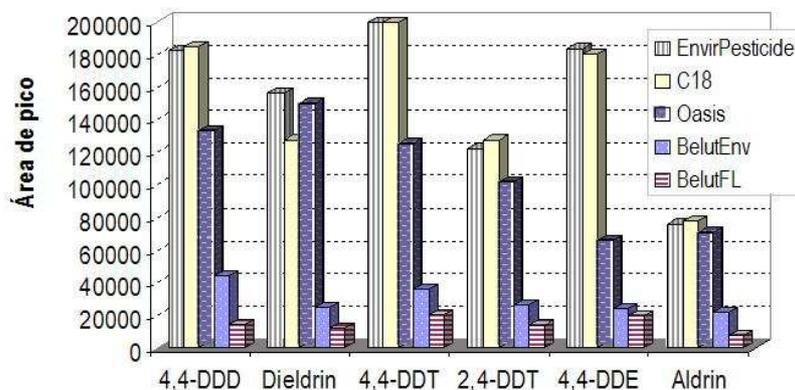


Figura 8.5: Elección del tipo de cartucho SPE

Optimización del volumen de absorción

Para optimizar el proceso MAME-SPE es necesario estudiar la cantidad y concentración del extracto MAME que va a pasar a través del cartucho SPE, al igual que se optimiza este parámetro en el acoplamiento MAE-SPE, cuando se utilizan disolventes orgánicos como extractanes en lugar de surfactantes [57].

Por tanto, se evaluó el efecto del volumen de muestra. Además, la muestra debe ser diluida para facilitar el paso y absorción de los analitos en el adsorbente sólido, a la vez que se minimiza la competencia que pudiese existir por los analitos entre el surfactante y el adsorbente.

La Figura 8.6 muestra una comparación entre las áreas de pico obtenidas usando 5 ml de extracto MAME (5 %, v/v) sin dilución (puro) y con dilución con agua bidestilada hasta diferentes volúmenes finales de muestra: 10 ml, 25 ml y 50 ml.

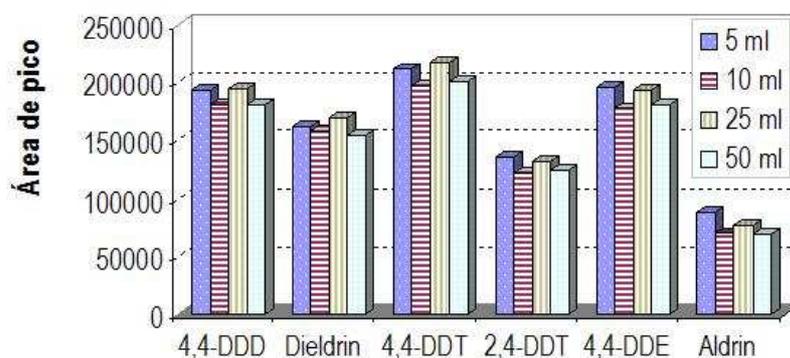


Figura 8.6: Optimización del volumen de absorción y dilución de la muestra

En dicha figura se puede observar que el volumen de muestra no afecta prácticamente al área de pico obtenida, según los resultados obtenidos para cada analito.

Sin embargo, a partir de 25 ml de volumen final de muestra la relación señal/ruido obtenida en el cromatograma es mayor, y por ello este volumen fue seleccionado como volumen más adecuado de muestra para la optimización de MAME-SPE y aplicaciones en muestras de algas.

Estudio del paso de lavado

Previo a la desorción, puede ser importante introducir un paso de lavado que permita realizar una limpieza del extracto de SPE [163], reduciendo las interferencias en la determinación de los analitos de interés.

Para la optimización de este paso, se fijó el volumen de la disolución de lavado en 5 ml para todos los casos. En la Figura 8.7 se puede observar la comparación de las áreas de pico obtenidas al lavar el cartucho tras la absorción, con diferentes soluciones de metanol-agua a diferentes proporciones (agua bidestilada pura, metanol al 5 % en agua bidestilada, al 10 %, 15 % y 20 %).

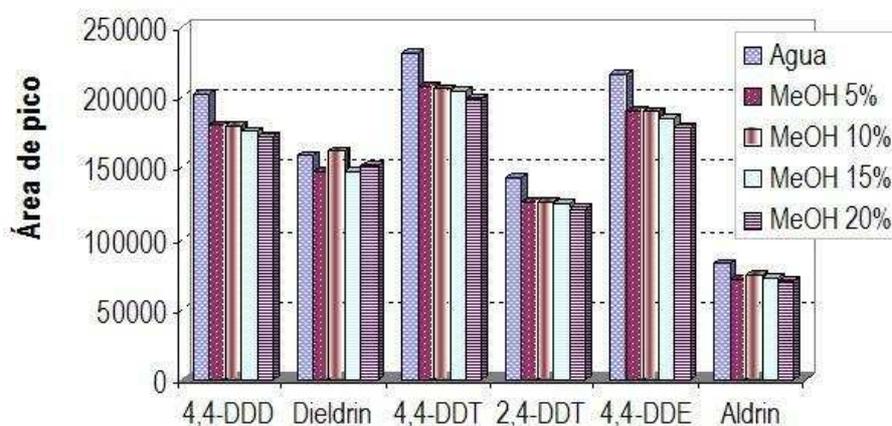


Figura 8.7: Optimización de la composición de la disolución de lavado

Las áreas obtenidas decrecen cuando se añade metanol en la disolución de lavado. Por ello elegimos como disolución de lavado 5 ml de agua bidestilada pura.

Optimización del volumen de desorción

Finalmente, para aumentar el factor de preconcentración en el procedimiento MAME-SPE, se probó a reducir el volumen de disolvente hasta un valor con el cual obtener una buena señal y una aceptable reproducibilidad del método. En la Figura 8.8 se pueden observar las áreas de pico obtenidas al reducir el volumen de metanol en la desorción.

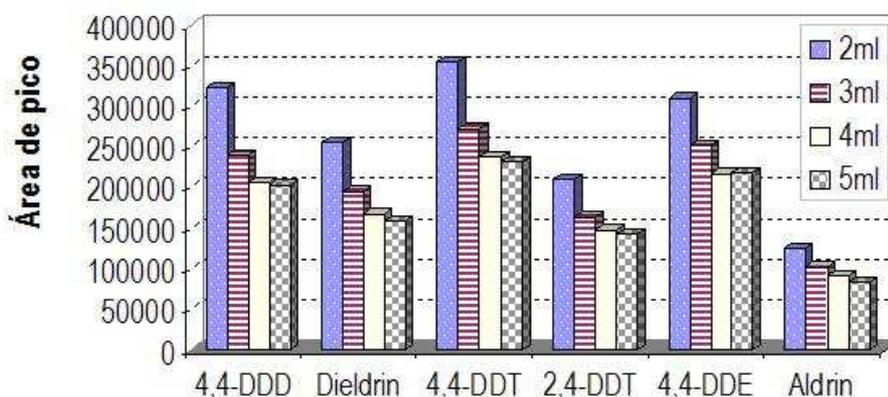


Figura 8.8: Optimización del volumen de desorción de la muestra

Al reducir dicho volumen aumenta el área de pico obtenida, aunque en algunos casos no de forma proporcional. Fijamos como volumen de desorción 2 ml porque es el volumen al cual se obtienen las mayores áreas de pico con resultados estables y reproducibles. Se encontró también que volúmenes menores provocaban resultados con baja reproducibilidad.

Este valor fue usado para determinar los parámetros analíticos del método y realizar las aplicaciones del mismo.

8.3.2. Parámetros analíticos y validación

Análisis Cromatográfico

El análisis de las muestras extraídas se realizó de la misma forma que en apartados anteriores, usando el sistema HPLC-UV con columna C₁₈ de 150 mm e inyección de 50 μ l de extracto.

Se midió la absorbancia de cada analito, correspondiente a la longitud de onda máxima. El tiempo de retención y la longitud de onda óptima para cada compuesto se enumeran en la Tabla A.4 (apartado A.3).

El cromatograma obtenido para la mezcla de seis pesticidas utilizando POLE como extractante y el cartucho SPE Envirelut-Pesticide 500mg, se muestra en la Figura 8.9.

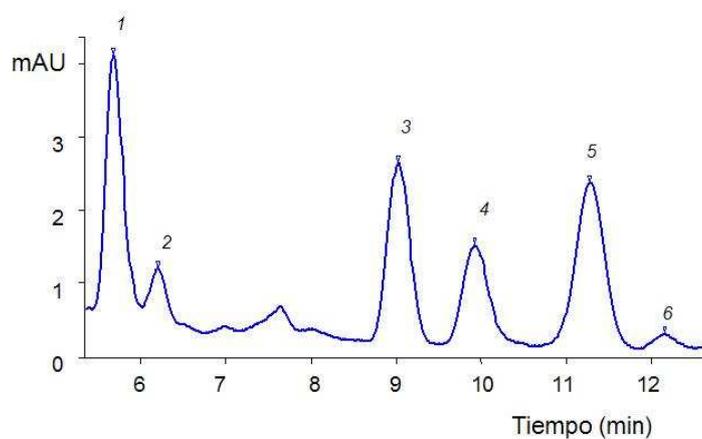


Figura 8.9: Cromatograma del extracto de alga de *Ulva rigida* utilizando MAME-SPE

En él se observa que la separación entre picos es suficiente para cuantificar satisfactoriamente los diferentes analitos.

Con el método de extracción MAME-SPE optimizado se obtienen picos mucho más definidos e intensos que si se inyectase directamente el extracto MAME, o incluso que con el método MAME-SPME. Además, se elimina la señal producida por el surfactante y por las interferencias de la matriz, obteniendo una mejor línea base, lo que nos va a permitir mejorar los límites de detección.

Parámetros Analíticos

Para determinar la precisión del método de extracción propuesto, se realizó el estudio de los parámetros analíticos del mismo con seis muestras de alga *Ulva rigida*. Las muestras se acondicionaron con la mezcla de pesticidas organoclorados, de manera que la concentración final de cada uno de ellos fuese la misma que la utilizada en el proceso de optimización ($4 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para el 4,4'-DDD, 4,4'-DDT, 2,4'-DDT y 4,4'-DDE y $8 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para el Aldrín y Dieldrín).

Estas muestras fueron sometidas al proceso completo MAME-SPE y a la posterior determinación por HPLC-UV.

Se calcularon las recuperaciones, las desviaciones estándar relativas y los límites de detección para todos los compuestos (Tabla 8.3). Los límites de detección se calcularon como tres veces la concentración correspondiente a la señal del ruido para cada pesticida [142], y varían entre $2 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ y $38 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ para todos los compuestos estudiados.

Analito	Recuperación (%)	RSD (%) ^a	LOD (ng·g ⁻¹) ^b
4,4'-DDD	92.9	3.5	12
Dieldrín	100.5	3.3	22
4,4'-DDT	92.6	2.8	2
2,4'-DDT	91.2	3.6	6
4,4'-DDE	107.7	5.3	2
Aldrín	78.8	4.6	38

a): Desviación estándar relativa

b): Límite de Detección

Tabla 8.3: Valores de recuperación, desviación estándar relativa y límites de detección obtenidos tras aplicar MAME-SPE

Las recuperaciones obtenidas están por encima del 90 % para todos los compuestos excepto para el Aldrín, con el que se obtuvieron recuperaciones ligeramente menores, y las desviaciones estándar relativas son inferiores al 5 % en todos los casos, excepto para el 4,4'-DDE que presenta un 5.3 %.

Validación del método con una mezcla certificada

Para poder determinar la aplicabilidad del método propuesto, éste se validó utilizando una mezcla de referencia certificada (Pesticide-Mix 5) que contenía cinco de los seis compuestos estudiados. Esta mezcla se utilizó para enriquecer las muestras de algas y determinar posteriormente las recuperaciones obtenidas con el método MAME-SPE y compararlas con las obtenidas utilizando el método de referencia Soxhlet (apartado 6.6).

Se utilizaron 0.5 gramos de muestra contaminada con $4 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de cada compuesto y se aplicaron las condiciones optimizadas para la extracción MAME-SPE. De igual forma, se utilizaron 0.5 g de muestra y se aplicó el método Soxhlet utilizando hexano como extractante durante 24 horas y 6-8 ciclos/hora.

En la Tabla 8.4 se muestran los pesticidas presentes en la mezcla certificada, las recuperaciones obtenidas usando el método MAME-SPE y Soxhlet, así como las desviaciones estándar relativas en ambos métodos.

Como se puede observar, las recuperaciones para ambos métodos son muy similares y satisfactorias en ambos casos, indicando que el procedimiento de extracción propuesto es válido para este tipo de matriz.

Analito	MAME-SPE		Soxhlet	
	Recuperación (%)	RSD ^a (%)	Recuperación (%)	RSD ^a (%)
4,4'-DDD	93.2	2.4	103.1	6.8
Dieldrín	101.4	3.5	98.3	7.5
4,4'-DDT	95.7	2.6	101.7	4.9
2,4'-DDT	88.9	4.8	86.2	5.7
4,4'-DDE	94.5	3.7	94.8	3.8

a): Desviación estándar relativa

Tabla 8.4: Validación del método MAME-SPE con Soxhlet usando una mezcla certificada (Pesticide-Mix 5)

8.3.3. Aplicación de MAME-SPE a muestras de algas

Tras optimizar los factores de los que depende el método de extracción MAME-SPE, diferentes tipos de algas fueron sometidas a las condiciones óptimas.

Las algas estudiadas fueron: *Ulva rigida*, *Valonia utricularis*, *Coralina elongata*, *Solieria filiformis* y *Gracilaria cornea*.

Éstas proceden de cultivos de algas de la isla de Gran Canaria. Las muestras fueron previamente acondicionadas, tal y como se explica en el apartado 6.2, con la mezcla de seis pesticidas organoclorados.

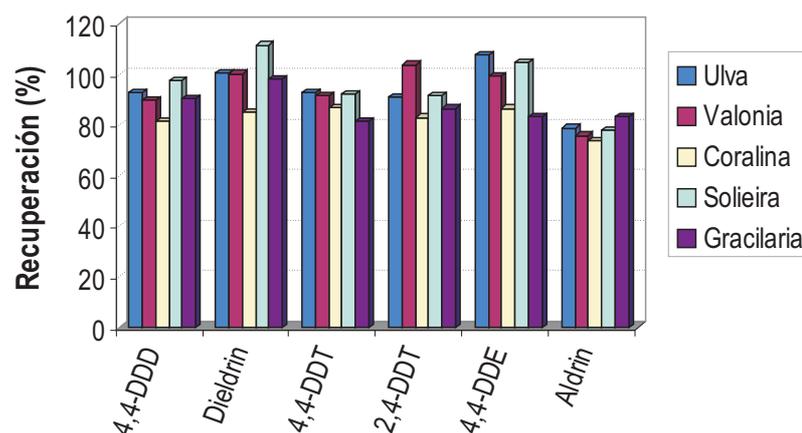


Figura 8.10: Recuperaciones obtenidas con MAME-SPE para distintas algas

Las recuperaciones obtenidas para dichas algas se muestran en la Figura 8.10. En esta figura se puede observar que las recuperaciones obtenidas utilizando el método MAME-SPE son muy satisfactorias, obteniéndose valores por encima del

80 % en todos los casos salvo para el compuesto aldrín, con el que se obtuvieron recuperaciones algo inferiores, probablemente debido a que el cartucho SPE elegido no sea el más acorde con sus características físico-químicas. Además, las recuperaciones obtenidas no varían mucho en función del tipo de alga utilizada.

8.4. Optimización de MAME-SPE en moluscos

Los pesticidas presentes en tierra tienen como destino final los sistemas acuáticos, debido al transporte atmosférico y a la lixiviación de los suelos por lluvias, que son arrastrados finalmente hasta el mar a través de los ríos y barrancos [158, 159]. Este hecho, unido a la altísima persistencia de los pesticidas organoclorados y a su hidrofobicidad, facilita de la absorción de los mismos con la materia orgánica pudiendo entonces ser incorporados por organismos filtradores como los moluscos.

Las variables que influyen en la extracción micelar asistida por microondas fueron optimizadas utilizando un diseño factorial, el cual permite variar simultáneamente los factores a la vez que se estudian sus efectos [138]. Para la optimización de las variables se acopló el proceso MAME a un procedimiento de limpieza a través de un cartucho de SPE.

A diferencia de los extractos MAME obtenidos para el resto de matrices estudiadas (suelos, fangos y algas), el extracto MAME procedente de moluscos no puede ser determinado directamente por HPLC-UV, debido a las altas interferencias que producen distintos compuestos extraídos desde la matriz, como son las proteínas.

La extracción en fase sólida puede ser acoplada con técnicas de extracción como MAME, como paso de limpieza para eliminar estas interferencias y a la vez producir una preconcentración de los analitos, previo a la determinación.

Se fijaron las variables cantidad de muestra, concentración y volumen de surfactante en:

- *Cantidad de muestra:* 1 gramo
- *Volumen de surfactante:* 10 ml
- *Concentración de surfactante:* 5 % (v/v)

Para el acoplamiento MAME-SPE usamos un cartucho Envirelut-Pesticide 500 mg en las condiciones optimizadas previamente (apartado 8.3.1).

El volumen de extracto MAME utilizado fue de 5 ml, diluido con agua bidestilada hasta 25 ml. Previo a la desorción, se realizó un paso de lavado con 5 ml de agua bidestilada para eliminar el exceso de surfactante y reducir las interferencias. Para incrementar la preconcentración en la extracción MAME-SPE, utilizamos el mínimo volumen de desorción (2 ml de metanol) que permita obtener una buena señal cromatográfica y una aceptable reproducibilidad del método (desviaciones estándar relativas menores al 10 %).

Las variables a estudiar son la potencia y tiempo de irradiación.

8.4.1. Optimización de la potencia y tiempo de irradiación

El estudio de estos factores se llevó a cabo con muestras de mejillones (*Mytilus edulis*). Se utilizó 1 gramo de mejillón liofilizado y triturado con un tamaño (volumen) de muestra de entre 10 y 20 mm^3 .

Se utilizó un diseño factorial 3^2 para optimizar potencia y tiempo conjuntamente.

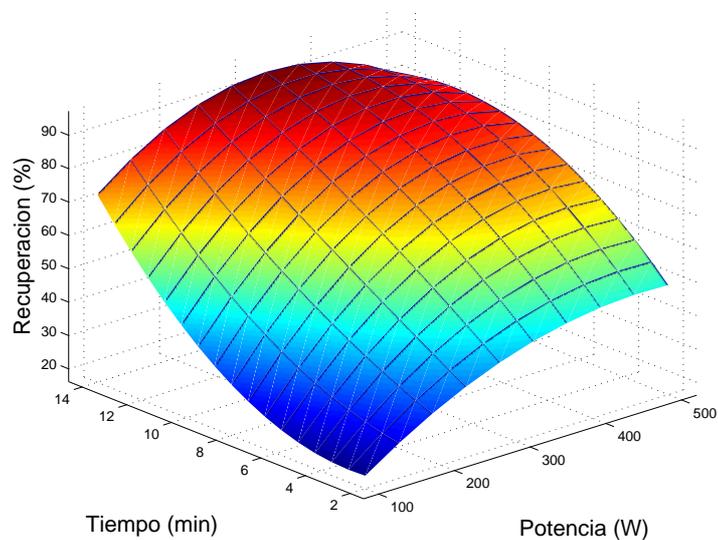


Figura 8.11: Superficie de respuesta potencia-tiempo para el 4,4'-DDT

Este diseño experimental permite obtener una superficie de respuesta entre ambas variables, combinando tres valores de la variable Potencia (100, 300 y 500 W) con tres valores de la variable Tiempo (2, 8 y 14 min). Teniendo en cuenta que se realiza un duplicado del punto central, se trata de un diseño de 10 muestras. Con la superficie de respuesta obtenida se puede calcular el valor óptimo de ambas variables para cada compuesto estudiado.

La Figura 8.11 muestra los valores óptimos de potencia y tiempo para el 4,4'-DDT aplicando el método MAME-SPE. El resto de compuestos presentan una tendencia similar. De estos resultados se deduce que la potencia y tiempo óptimos son 300W y 14 minutos respectivamente.

8.4.2. Parámetros analíticos y validación

Análisis Cromatográfico

El análisis de las muestras extraídas se realizó de la misma forma que en apartados anteriores, usando un sistema HPLC-UV con una columna C_{18} de 150 mm e inyectando 50 μ l de extracto MAME-SPE.

Se midió la absorbancia de cada analito, correspondiente a la longitud de onda máxima. El tiempo de retención y la longitud de onda óptima para cada compuesto se enumeran en la Tabla A.4 (apartado A.3).

El cromatograma obtenido para la extracción de la mezcla de seis pesticidas organoclorados de muestras de mejillón, utilizando POLE como extractante y el cartucho SPE Envirelut-Pesticide 500 mg, se muestra en la Figura 8.12.

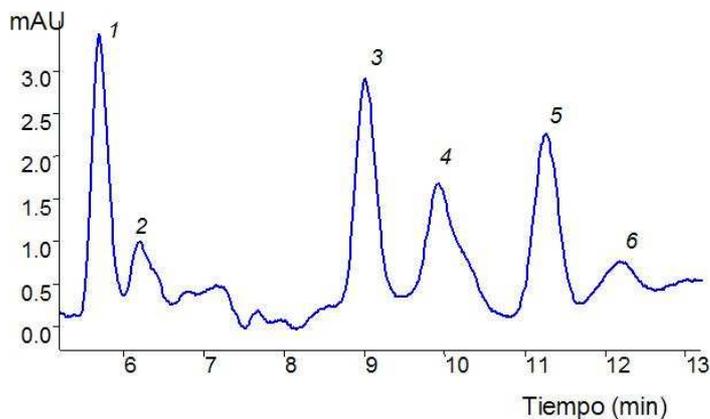


Figura 8.12: Cromatograma del extracto de mejillón utilizando MAME-SPE

En el cromatograma se observa que la separación entre picos es suficiente para determinar satisfactoriamente los diferentes analitos. Con el método de extracción MAME-SPE optimizado se obtienen picos mucho más definidos e intensos que si

se inyectase directamente el extracto MAME, y además se eliminan interferencias y proteínas que causarían daños en la columna cromatográfica. La cola producida en el pico 4 (2,4'-DDT) es debido a interferencias con la matriz, pero no perjudica en la cuantificación del analito.

Parámetros Analíticos

Para determinar la precisión del método de extracción y determinación propuesto, se realizó el estudio de los parámetros analíticos del mismo con seis muestras de mejillón. Las muestras se acondicionaron con la mezcla de pesticidas organoclorados, de manera que la concentración final de cada uno de ellos fuese la misma que la utilizada en el proceso de optimización ($2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para el 4,4'-DDD, 4,4'-DDT, 2,4'-DDT y 4,4'-DDE y $4 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para el Aldrín y Dieldrín).

Estas muestras fueron sometidas al proceso completo MAME-SPE y a la posterior separación y determinación por HPLC-UV.

Se calcularon las recuperaciones, las desviaciones estándar relativas y los límites de detección para todos los compuestos (Tabla 8.5). Los límites de detección se calcularon como tres veces la concentración correspondiente a la señal del ruido para cada pesticida [142], y varían entre $6 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ y $38 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ para todos los compuestos estudiados.

Las recuperaciones obtenidas son satisfactorias en todos los casos (por encima del 84 %) salvo para el caso del Aldrín, igual que ocurrió con las algas, probablemente debido a que el cartucho SPE elegido no es el más idóneo para este compuesto en concreto. Las desviaciones estándar relativas varían en función del tipo de compuesto analizado, pero en ningún caso son superiores al 10 %.

Analito	Recuperación (%)	RSD (%) ^a	LOD (ng·g ⁻¹) ^b
4,4'-DDD	84.5	7.1	19
Dieldrín	92.6	8.0	21
4,4'-DDT	97.8	5.4	38
2,4'-DDT	94.1	7.7	9
4,4'-DDE	100.4	3.9	6
Aldrín	68.2	9.3	26

a): Desviación estándar relativa

b): Límite de Detección

Tabla 8.5: Valores de recuperación, desviación estándar relativa y límites de detección obtenidos tras aplicar MAME-SPE

Validación del método con una mezcla certificada

Para poder determinar la aplicabilidad del método propuesto, se validó utilizando una mezcla de referencia certificada (Pesticide-Mix 5) que contenía cinco de los seis compuestos estudiados. Esta mezcla se utilizó para enriquecer las muestras de moluscos y determinar posteriormente la recuperaciones con el método MAME-SPE, así como poder compararlas con las obtenidas utilizando el método de referencia Soxhlet (apartado 6.6).

En la Tabla 8.6 se muestran los pesticidas presentes en la mezcla certificada, las recuperaciones obtenidas usando el método MAME-SPE y Soxhlet, así como las desviaciones estándar relativas de ambos métodos.

Se utilizó 1 gramo de muestra contaminada con 2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de cada compuesto, y se aplicaron los valores optimizados de potencia y tiempo así como el resto de las condiciones óptimas para la extracción MAME-SPE. Como se puede observar, las

Analito	MAME-SPE		Soxhlet	
	Recuperación (%)	RSD ^a (%)	Recuperación (%)	RSD ^a (%)
4,4'-DDD	102.3	5.4	101.2	8.0
Dieldrín	92.8	7.8	89.6	8.4
4,4'-DDT	98.6	4.1	91.7	5.9
2,4'-DDT	87.8	6.8	84.9	9.2
4,4'-DDE	94.3	5.3	96.7	6.1

a): Desviación estándar relativa

Tabla 8.6: Validación del método MAME-SPE con Soxhlet usando una mezcla certificada (Pesticide-Mix 5)

recuperaciones para ambos métodos son muy similares y satisfactorias en ambos casos, indicando que el procedimiento de extracción y determinación propuesto es válido para este tipo de matriz.

8.4.3. Aplicación de MAME-SPE a muestras de moluscos

Tras optimizar los factores de los que depende el método de extracción MAME-SPE, diferentes tipos de moluscos fueron sometidos a las condiciones óptimas. Los moluscos estudiados fueron: Almejas (*Ruditapes decussatus*), Berberechos (*Ruditardium tuberculatum*), Mejillones (*Mytilus edulis*), Coquinas (*Donax trunculus*) y Caracoles (*Cochlicella barbara*). Éstas proceden de diferentes distribuciones comerciales de la isla de Gran Canaria y fueron previamente liofilizadas, trituradas y acondicionadas, tal y como se explica en el apartado 6.2, con la mezcla de seis pesticidas organoclorados.

Las recuperaciones obtenidas para los moluscos estudiados se muestran en la Figura 8.13.

En dicha figura se puede observar que las recuperaciones obtenidas utilizando el método MAME-SPE son muy satisfactorias salvo para el Aldrin, probablemente debido a interferencias con la matriz; para el resto de compuestos los porcentajes de recuperación obtenidos son superiores al 80 % para todos los tipos de moluscos.

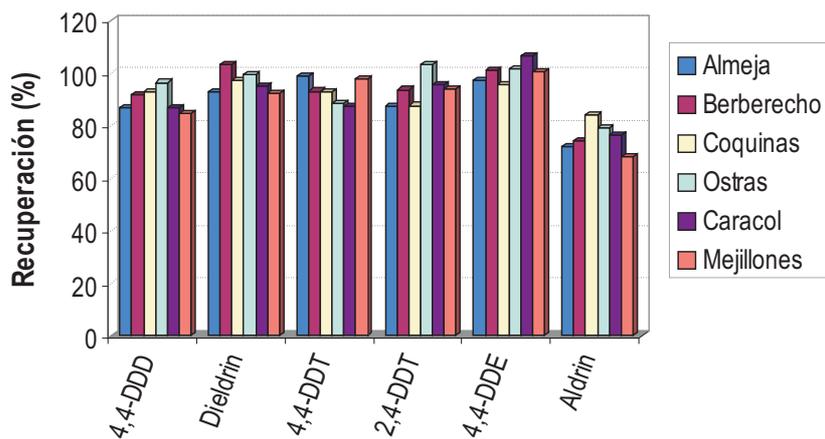


Figura 8.13: Recuperaciones obtenidas con MAME-SPE para distintos moluscos

IV

Conclusiones

Conclusiones

De los estudios realizados en el presente trabajo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Se desarrolla un método de extracción de pesticidas contenidos en muestras sólidas, basado en combinar el poder de solubilización de los surfactantes y la acción de la radiación de microondas en un recipiente cerrado. Para cada surfactante usado se optimizaron los parámetros de los que depende el proceso. La optimización de las variables se llevó a cabo utilizando un diseño factorial debido a las posibles interacciones entre las mismas.
2. Los valores obtenidos en la optimización de condiciones muestran que el volumen de la disolución de surfactante debe ser suficiente como para que toda la muestra quede humedecida, un valor de 8 ml es suficiente para que el proceso ocurra de manera eficiente. Al aumentar el volumen de la disolución de surfactante no mejora la eficiencia de la extracción, pero sí supone un aumento indeseable de la temperatura en el interior de los vasos del microondas.
3. Para la extracción de pesticidas en muestras de suelos y fangos es necesario

tener en cuenta las características de la matriz, fundamentalmente el contenido en materia orgánica y la textura de la misma. Dentro de los valores elegidos para nuestro estudio, la granulometría de la matriz se mostró como el factor que más influencia tenía sobre el proceso de extracción.

4. Los resultados obtenidos en la extracción de pesticidas en las distintas matrices son bastante satisfactorios con los los diferentes surfactantes utilizados, si bien, la mezcla POLE-tridecil presenta valores más bajos que el resto de surfactantes.
5. Para validar el método de extracción de pesticidas en muestras de suelos y fangos mediante la extracción micelar asistida por microondas, se aplicó el método desarrollado a una muestra certificada que contenía los pesticidas objeto de estudio. En todos los casos los resultados fueron satisfactorios.
6. Los porcentajes de recuperación obtenidos con muestras envejecidas, previamente enriquecidas con la mezcla de pesticidas, disminuyen con el tiempo de acondicionamiento. En algunos casos la recuperación no disminuye notablemente pasadas las dos primeras semanas, y en ningún caso aumentan los metabolitos de degradación; lo que indica que el proceso que está ocurriendo es la absorción y adsorción de los analitos en el suelo, pero no su degradación.
7. La utilización de MAME en la extracción de pesticidas organoclorados en distintas matrices pone de manifiesto que dicha técnica es una buena alternativa a los métodos convencionales. Las principales ventajas del proceso son la reducción de la cantidad de muestra necesaria para el análisis, la sustitución de disolventes orgánicos por otros extractantes menos tóxicos y más baratos, la posibilidad de realizar de forma simultánea un número elevado

de extracciones y una considerable reducción en el tiempo de análisis.

8. Para mejorar la determinación de los pesticidas organoclorados en matrices complejas, puede ser adecuado introducir un paso posterior a la extracción, de limpieza y preconcentración, como puede ser la microextracción en fase sólida (SPME) y la extracción en fase sólida (SPE).
9. El acoplamiento MAME-SPME supone una alternativa que incrementa la selectividad y sensibilidad del método, limpiando el extracto de interferencias de la matriz y produciendo una preconcentración de los analitos de interés.
10. El procedimiento MAME-SPME permite determinar los pesticidas organoclorados en suelos, fangos y algas con resultados muy satisfactorios, recuperaciones cercanas al 100 % y reproducibilidades (RSD) inferiores en la mayor parte de los casos, al 10 %.
11. El acoplamiento MAME-SPE posee todas las ventajas del procedimiento MAME-SPME, pero además es un método más rápido, más sensible, ya que produce una mayor preconcentración, y permite la extracción de varias muestras simultáneamente sin incrementar el coste instrumental ni analítico.
12. El procedimiento MAME-SPE permite determinar los pesticidas organoclorados en diferentes matrices, incluidas matrices biológicas, con resultados muy satisfactorios, de una manera eficiente, con bajo coste y no perjudicial para el medioambiente.
13. Para validar el método de extracción de pesticidas en muestras de algas y moluscos, mediante la extracción micelar asistida por microondas acopladas a SPE, se aplicó el método desarrollado a muestras enriquecidas con una

mezcla certificada que contenía los pesticidas objeto de estudio y se comparó con el método de referencia Soxhlet. En todos los casos los resultados fueron satisfactorios, obteniéndose para ambos procedimientos recuperaciones cercanas al 100 %.

14. Ambas metodologías MAME-SPME y MAME-SPE permitirían realizar la determinación de los analitos de interés en diferentes sistemas cromatográficos incompatibles con el extracto MAME, por tratarse de una disolución acuosa. Tal sería el caso de la cromatografía de gases con detector de captura de electrones o detector de masas. Estos sistemas permitirían incrementar notablemente la sensibilidad del método y disminuir los límites de detección en la determinación de pesticidas organoclorados.

V

Bibliografía

Bibliografía

- [1] Persistent bioaccumulative and toxic (pbt) chemical program. U. P.-B.-T. P. P. P. W. Group; August , (2000).
- [2] Pesticide program residue monitoring 2001. Food and Drug Administration (FDA), USA.
- [3] D. Knowles, Ed., *Chemistry and Technology of Agrochemical Formulations*, Kluwer Academic Publishers. Tonbridge, Kent, UK, 1998.
- [4] M. F. Waxman, *Agrochemical and Pesticide safety handbook*, Lewis Publishers, 1998.
- [5] E. Freire Gaspar de Carvalho Dores, L. Carbo, and A. Bergson Gonçalves de Abreu, *Serum DDT in malaria vector control sprayers in Mato Grosso State, Brazil*, Vol. 19, Cadernos de Saúde Pública. Rio de Janeiro, 2003.
- [6] D. Barceló, *Analyst*, **116**, 681–688 (1991).
- [7] E. Peris, S. Requena, M. de la Guardia, A. Pastor, and J. Carrasco, *Chemosphere*, **60**, 1542–1549 (2005).
- [8] J. A. Dwasi, *Regulation of Pesticides in Developing Countries*, Environmental Law Institute, USA, 2001.

-
- [9] K. Feng, B. Yu, D. Ge, M. Wong, X. Wang, and Z. Cao, *Chemosphere*, **50**, 683–687 (2003).
- [10] D. Ueno, H. Iwata, S. Tanabe, K. Ikeda, J. Koyoma, and H. Yamada, *Marine Pollution Bulletin*, **45**, 254–261 (2002).
- [11] D. Hela, I. Konstantinou, T. Sakellarides, D. Lambropoulou, T. Akriotis, and T. Albanis, *Arch. Environmental Contam. Toxicol.*, **50**, 603–613 (2006).
- [12] E. Kusvuran and O. Erbatur, *Journal of Hazardous Materials*, **106B**, 115–125 (2004).
- [13] The stockholm convention on pops: A global public health treaty. United Nations, May , (2001).
- [14] U. E. P. A. EPA Persistent organic pollutants: A global issue, a global response; <http://www.epa.gov/international>, April , (2002).
- [15] K. Lee, S. Tanabe, and C. Koh, *Environmental Pollution*, **2001**, 207–213 (114).
- [16] S. Waliszewski, O. Carvajal, R. Infanzon, P. Trujillo, A. Aguirre, and M. Maxwell, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 7045–7050 (2004).
- [17] M. Maroni, C. Colosio, A. Ferioli, and A. Fait, *Toxicology*, **143**, 61–75 (2000).
- [18] R. Doong, C. Peng, Y. Sun, and P. Liao, *Marine Pollution Bulletin*, **45**, 246–253 (2002).
- [19] W. Zhuang, B. McKague, D. Reeve, and J. Carey, *Chemosphere*, **54**, 467–480 (2004).

- [20] A. Zhulidov, R. Robarts, J. Headley, K. Liber, D. Zhulidov, O. Zhulidova, and D. Pavlov, *The Science of the Total Environment*, **292**, 231–246 (2002).
- [21] W. Vetter, M. Weichbrodt, E. Scholz, B. Luckas, and H. Oelschläger, *Marine Pollution Bulletin*, **38**, 830–836 (1999).
- [22] B. Munday, N. Stewart, and A. Södergren, *Environmental Pollution*, **120**, 233–237 (2002).
- [23] W. Chen, L. Zhang, L. Xu, X. Wang, L. Hong, and H. Hong, *Marine Pollution Bulletin*, **45**, 385–390 (2002).
- [24] M. Megharaj, D. Kantachote, I. Singleton, and R. Naidu, *Environmental Pollution*, **109**, 35–42 (2000).
- [25] M. Moreno Frías, A. Garrido Frenich, J. Martínez Vidal, M. Mateu Sánchez, F. Olea, and N. Olea, *Journal of Chromatography B*, **760**, 1–15 (2001).
- [26] H. Shivaramaiah, I. Odeh, I. Kennedy, and J. Skerritt, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 5360–5367 (2002).
- [27] A. Nawab, A. Aleem, and A. Malik, *Bioresource Technology*, **88**, 41–46 (2003).
- [28] Toxic substance control act. U.S. Environmental Protection Agency (EPA), Washington DC, (1979).
- [29] F. Ahmed, *Trends in Analytical Chemistry*, **20**, 649–661 (2001).
- [30] P. Buldini, L. Ricci, and J. Sharma, *Journal of Chromatography A*, **975**, 47–70 (2002).

- [31] J. Harris, *Chemical Pesticide Markets, Health Risks and Residues*, CAB International, 2000.
- [32] M. Garmouma and L. Poissant, *Atmospheric Environment*, **38**, 369–382 (2004).
- [33] G. Shukla, A. Kumar, M. Bhanti, P. Joseph, and A. Taneja, *Environmental International*, **32**, 244–247 (2006).
- [34] Toxicological profile for ddt, dde and ddd. u.s. department of health and human services. agency for toxic substances and disease registry.
- [35] Toxicological profile for aldrin/dieldrin. u.s. department of health and human services. agency of toxic substances and disease registry.
- [36] C. Tomlin, Ed., *The Pesticide Manual. Eleventh Edition*, British Crop Protection Council, 1997.
- [37] A. Covaci, A. Gheorghe, and P. Schepens, *Chemosphere*, **56 (8)**, 757–766 (2004).
- [38] P. Sandra, B. Tienpont, and F. David, *Journal of Chromatography A*, **1000**, 299–309 (2003).
- [39] B. Botella, J. Crespo, A. Rivas, I. Cerrillo, M. Olea-Serrano, and N. Olea, *Environmental Research*, **96**, 34–40 (2004).
- [40] M. Falcón, J. Oliva, E. Osuna, A. Barba, and A. Luna, *Toxicology*, **195**, 203–208 (2004).
- [41] F. Roma Paumgartten, I. Fernandes Delgado, E. Santos Oliveira, I. Baptista Alleluia, H. Barretto, and T. Kussumi, *Levels of organochlorine pesticides*

- in the blood serum of agricultural workers from Rio de Janeiro State, Brazil*, Vol. 14, Cadernos de Saúde Pública, 1998.
- [42] S. Bréga, I. Vassilieff, A. Almeida, A. Mercadante, D. Bissacot, P. Cury, and D. Freire-Maia, *Clinical, cytogenetic and toxicological studies in rural workers exposed to pesticides in Botucatu, Sao Paulo, Brazil*, Vol. 14, Cadernos de Saúde Pública, 1998.
- [43] S. Tao, F. Xu, X. Wang, W. Liu, Z. Gong, J. Fang, L. Zhu, and Y. Luo, *Environmental Science Technology*, **39**, 2494–2499 (2005).
- [44] O. Tsydenova, T. Minh, N. Kajiwara, V. Batoev, and S. Tanabe, *Marine Pollution Bulletin*, **48**, 749–758 (2004).
- [45] A. Pinkney and P. McGowan, *Environmental Monitoring and Assessment*, **120**, 559–574 (2006).
- [46] V. Camel, *Analytical Bioanalytical Chemistry*, **372**, 39–40 (2002).
- [47] A. Deger, T. Gremm, and F. Frimmel, *Acta Hydrochim. Hydrobiol.*, **28**, 292–299 (2000).
- [48] N. Ochiai, K. Sasamoto, H. Kanda, T. Yamagami, F. David, B. Tienpont, and P. Sandra, *Journal of Separation Science*, **28**, 1083–1092 (2005).
- [49] P. Parrilla and J. Martínez Vidal, *Chromatographia*, **43**(5/6), 265–270 (1996).
- [50] A. Sanusi, V. Guillet, and M. Montury, *Journal of Chromatography A*, **1046**, 35–40 (2004).

-
- [51] L. Fitzpatrick, J. Dean, M. Comber, K. Harradine, and K. Evans, *Journal of Chromatography A*, **874**, 257–264 (2000).
- [52] S. Sporring, S. Bowadt, B. Svensmark, and E. Björklund, *Journal of Chromatography A*, **1090**, 1–9 (2005).
- [53] M. Punín Crespo and M. Lage Yusty, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **64**, 400–405 (2006).
- [54] O. Zuloaga, N. Etxebarria, L. Fernández, and J. Madariaga, *Fresenius Journal Analytical Chemistry*, **367**, 733–737 (2000).
- [55] D. Mutavdzic, A. Horvat, S. Babic, and M. Kastelan-Macan, *Journal Sep. Science*, **28**, 1485–1492 (2005).
- [56] P. Navarro, E. Cortazar, L. Bartolomé, M. Deusto, J. Raposo, O. Zuloaga, G. Arana, and N. Etxebarria, *Journal of Chromatography A*, **1128**, 10–16 (2006).
- [57] E. Papadakis and E. Papadopoulou-Mourkidou, *International J. Environmental Analytical Chemistry*, **86**, 573–582 (2006).
- [58] S. Bieri, Y. Ilias, C. Bicchi, J. Veuthey, and P. Christen, *Journal of Chromatography A*, **1112**, 127–132 (2006).
- [59] W. Ho and S. Hsieh, *Analytica Chimica Acta*, **428**, 111–120 (2001).
- [60] E. Pramauro and E. Pelizzetti, *Surfactants in Analytical Chemistry*, Elsevier Science, 1996.
- [61] M. Rosen, *Surfactants and Interfacial Phenomena*, Wiley Interscience, 1989.

- [62] Y. Moroi, *Micelles: Theoretical and Applied Aspects*, Plenum Press, 1992.
- [63] W. Hinze and E. Pramauro, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **24** (2), 133–177 (1993).
- [64] J. Israelachvil, *Intermolecular and Surface Forces.*, Academic Press, UK., 1992.
- [65] S. Rubio and D. Pérez-Bendito, *Trends in Analytical Chemistry*, **22**, 470–485 (2003).
- [66] K. Urich, S. Cannizzaro, R. Langer, and K. Shakesheff, *Chemical Reviews*, **99**, 3181–3198 (1999).
- [67] E. Pellizzetti and E. Pramauro, *Analytica Chimica Acta*, **169**, 1 (1985).
- [68] J. Hernández García, Z. Sosa Ferrera, A. Bermejo Martín-Lázaro, and J. Santana Rodríguez, *Analytical Letters*, **27** (7), 1355 (1994).
- [69] J. de Boer and R. Law, *Journal of Chromatography A*, **1000**, 223–251 (2003).
- [70] C. Gonçalves and M. Alpendurada, *Talanta*, **65**, 1179–1189 (2005).
- [71] D. Lambropoulou and T. Albanis, *Analytica Chimica Acta*, **514**, 125–130 (2004).
- [72] K. Li, M. Landrialult, M. Fingas, and M. Llompart, *Journal of Hazardous Materials*, **102**, 93–104 (2003).
- [73] A. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, and R. Marcé, *Trends in Analytical Chemistry*, **18** (8), 557–567 (1999).

- [74] M. Barriada-Pereira, E. Concha-Graña, M. González-Castro, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez, and E. Fernández-Fernández, *Journal of Chromatography A*, **1008**, 115–122 (2003).
- [75] R. Sanghi and S. Kannamkumarath, *Journal of Analytical Chemistry*, **59**, 1032–1036 (2004).
- [76] V. López-Ávila, R. Young, and W. Beckert, *Analytical Chemistry*, **66**, 1097–1106 (1994).
- [77] F. Esteve-Turrillas, C. Aman, A. Pastor, and M. de la Guardia, *Analytica Chimica Acta*, **522**, 73–78 (2004).
- [78] M. Numata, T. Yarita, Y. Aoyagi, and A. Takatsu, *Analytical Sciences*, **20**, 793–798 (2004).
- [79] E. Concha-Graña, M. Barriada-Pereira, M. Turnes-Carou, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, and D. Prada Rodríguez, *Anal Bioanalytical Chemistry*, **375**, 1225–1228 (2003).
- [80] V. Pino, J. Ayala, A. Afonso, and V. González, *Journal of Chromatography A*, **869**, 515–522 (2000).
- [81] L. Fitzpatrick and J. Dean, *Analytical Chemistry*, **74**, 74–79 (2002).
- [82] Y. Lang, Z. Cao, and X. Jiang, *Talanta*, **66**, 249–252 (2005).
- [83] C. Eskilson and E. Björklund, *Journal of Chromatography A*, **902**, 227–250 (2000).
- [84] H. Pylypiw, T. Arsenault, C. Thetford, and M. Incorvia, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**, 3522–3528 (1997).

- [85] V. López-Ávila, R. Young, J. Benedicto, P. Ho, R. Kim, and W. Beckert, *Analytical Chemistry*, **67**, 2096 (1995).
- [86] C. Molins, E. Hogendoorn, H. Heusinkveld, P. Van Zoonen, and R. Baumann, *Intern. Journal of Environmental Analytical Chemistry*, **68(2)**, 155–169 (1997).
- [87] D. Chunhui, J. Ji, N. Li, Y. Yu, G. Duan, and X. Zhang, *Journal of Chromatography A*, **1117**, 115–120 (2006).
- [88] A. Blanco Prevot, M. Gulmini, V. Zelano, and E. Pramauro, *Analytical Chemistry*, **73**, 3790–3795 (2001).
- [89] Z. Sosa Ferrera, C. Padrón Sanz, C. Mahugo Santana, and J. J. Santana Rodríguez, *Trends in Analytical Chemistry*, **23**, 469–479 (2004).
- [90] C. Padrón-Sanz, R. Halko, Z. Sosa-Ferrera, and J. J. Santana-Rodríguez, *Journal of Chromatography A*, **1078**, 13–21 (2005).
- [91] C. Mahugo Santana, Z. Sosa Ferrera, and J. J. Santana Rodríguez, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **382**, 125–133 (2005).
- [92] C. Arthur, L. Killam, K. Buchholz, and J. Pawliszyn, *Analytical Chemistry*, **84**, 1960–1966 (1992).
- [93] R. Boussahel, S. Bouland, K. Moussaoui, M. Baudu, and A. Montiel, *Water Research*, **36**, 1909–1911 (2002).
- [94] L. Cai, J. Xing, L. Dong, and C. Wu, *Journal of Chromatography A*, **1015**, 11–21 (2003).
- [95] B. Hwang and M. Lee, *Journal of Chromatography A*, **898**, 245–256 (2000).

- [96] B. Albero, C. Sánchez-Brunete, and J. Tadeo, *Journal of Chromatography A*, **1007**, 137–143 (2003).
- [97] F. Hernández, J. Beltran, F. López, and J. Gaspar, *Analytical Chemistry*, **72**, 2313–2322 (2000).
- [98] K. Chia, T. Lee, and S. Huang, *Analytica Chimica Acta*, **527**, 157–162 (2004).
- [99] R. Doong and P. Liao, *Journal of Chromatography A*, **918**, 177–188 (2001).
- [100] M. Volante, M. Pontello, L. Valoti, M. Cattaneo, M. Bianchi, and L. Colzani, *Pest Management Science*, **56**, 618–636 (2000).
- [101] S. Millán, M. Sampedro, N. Unceta, M. Goicolea, E. Rodríguez, and R. Barrio, *Journal of Chromatography A*, **995**, 135–142 (2003).
- [102] J. Pawliszyn, *Solid phase microextraction, theory and practice*, Wiley-VCH, New York, 1997.
- [103] H. Lord and J. Pawliszyn, *Journal of Chromatography A*, **885**, 153–193 (2000).
- [104] D. Louch, S. Motlagh, and J. Pawliszyn, *Analytical Chemistry*, **64**(10), 1187–1199 (1992).
- [105] H. Li, G. Li, and J. Jen, *Journal of Chromatography A*, **1012**, 129–137 (2003).
- [106] D. Lambropoulou, I. Konstantinou, and T. Albanis, *Analytica Chimica Acta*, **573-574**, 223–230 (2006).

-
- [107] C. Aguilar, A. Peñalver, E. Pocurull, J. Ferré, F. Borrull, and R. Marcé, *Journal of Chromatography A*, **844**, 425–432 (1999).
- [108] G. Hook, G. Kimm, T. Hall, and P. Smith, *Trends in Analytical Chemistry*, **21 (8)**, 534–542 (2002).
- [109] J. Aulakh and A. Malik, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **35**, 71–85 (2005).
- [110] L. Cárdenes, J. Ayala, A. Afonso, and V. González, *Journal of Chromatography A*, **1030**, 87–93 (2004).
- [111] A. Boyd-Boland and J. Pawliszyn, *Analytical Chemistry*, **68**, 1521–1529 (1996).
- [112] H. Lin, Y. Sung, and S. Huang, *Journal of Chromatography A*, **1012**, 57–66 (2003).
- [113] I. Valor, M. Pérez, C. Cortada, D. Apraiz, J. Moltó, and G. Font, *J. Sep. Science*, **24**, 39–48 (2001).
- [114] H. Prosen and L. Zupancic-Kralj, *Trends in Analytical Chemistry*, **18**, 272–282 (1999).
- [115] A. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, and R. Marcé, *Journal of Chromatography A*, **953**, 79–87 (2002).
- [116] J. Beltrán, F. López, and F. Hernández, *Journal of Chromatography A*, **885**, 389–404 (2000).
- [117] G. Vas and V. Károly, *Journal of Mass Spectrometry*, **39**, 233–254 (2004).

- [118] S. Magdic and J. Pawliszyn, *Journal of Chromatography A*, **723**, 111–122 (1996).
- [119] L. Krutz, S. Senseman, and A. Sciumbato, *Journal of Chromatography A*, **999**, 103–121 (2003).
- [120] J. Pawliszyn, *Applications of Solid Phase Microextraction*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1999.
- [121] R. Cela, R. Lorenzo, and M. Casais, *Técnicas de separación en química analítica*, Editorial Sintesis, 2002.
- [122] R. Marcé and F. Borrul, *Journal of Chromatography A*, **885**, 273–290 (2000).
- [123] C. Poole, *Trends in Analytical Chemistry*, **22**(6), 362–373 (2003).
- [124] C. González-Piñuela, R. Alonso-Salces, A. Andrés, I. Ortiz, and J. Viguri, *Journal of Chromatography A*, **1129**, 189–200 (2006).
- [125] M. Barriada-Pereira, M. González-Castro, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez, and E. Fernández-Fernández, *Journal of Chromatography A*, **1061**, 133–139 (2004).
- [126] J. Hong, H. Kim, D. Kim, J. Seo, and K. Kim, *Journal of Chromatography A*, **1038**, 27–35 (2004).
- [127] M. Wells and L. Yu, *Journal of Chromatography A*, **885**, 237–250 (2000).
- [128] M. Helaleh, A. Omair, N. Ahmed, and B. Gevao, *Analytical Bioanalytical Chemistry*, **382**, 1127–1134 (2005).
- [129] EPA Method 8041. Environmental Protection Agency, Washington, DC, p.1 ed., (1995).

- [130] N. Tomiyama, H. Tsuji, M. Watanabe, M. Takeda, T. Harada, and H. Kobayashi, *Journal of Chromatography B*, **748**, 361–368 (2000).
- [131] W. Champion, J. Lee, A. Garrison, J. DiMarco, A. Matabe, and K. Prickett, *Journal of Chromatography A*, **1024**, 55–62 (2004).
- [132] A. International, Ed., AOAC Official Methods of Analysis, 2000; chapter 10, page 1.
- [133] A. International, Ed., AOAC Official Methods of Analysis, 2000; chapter 2, Fertilizers, page 40.
- [134] W. Sauerlandt and H. Berwecke, *Z. Pflanz. Düng. Bodenk.*, **56**, 204–226 (1952).
- [135] I. Bisutti, I. Hilke, and M. Raessler, *Trends in Analytical Chemistry*, **23**, 716–726 (2004).
- [136] V. Andreu and Y. Picó, *Trends in Analytical Chemistry*, **23**, 772–789 (2004).
- [137] H. Mwevura, O. Othman, and G. Mhehe, *Marine Pollution Bulletin*, **45**, 262–267 (2002).
- [138] V. Pino, J. Ayala, A. Afonso, and V. González, *International Journal Environ. Analytical Chemistry*, **81**, 281–294 (2001).
- [139] E. Cortazar, L. Bartolomé, A. Delgado, N. Etxebarria, L. Fernández, A. Usobiaga, and O. Zuloaga, *Analytica Chimica Acta*, **534**, 247–254 (2005).
- [140] M. Gfrerer and E. Lankmayr, *Analytica Chimica Acta*, **533**, 203–211 (2005).
- [141] I. Grice, M. Salzmann, I. Stiff, and L. Griffiths, *Journal Liq. Chromatography & Related Techniques*, **22(15)**, 2237–2344 (1999).

- [142] S. Lindsay, *High Performance Liquid Chromatography*, Wiley, New York, 1992.
- [143] S. Dupeyron, P. Dudermeil, and D. Counturier, *Analisis*, **25**, 286–292 (1997).
- [144] A. Covaci, P. Manirakiza, and P. Schepens, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **68**, 97–103 (2002).
- [145] M. Crespín, M. Gallego, and M. Valcárcel, *Journal of Chromatography A*, **897**, 279–293 (2000).
- [146] T. Harner, J. Wideman, L. Jantunen, T. Bidleman, and W. Parkhurst, *Environmental Pollution*, **106**, 323–332 (1999).
- [147] Z. Gong, S. Tao, F. Xu, R. Dawson, W. Liu, Y. Cui, J. Cao, X. Wang, W. Shen, W. Zhang, B. Qing, and R. Sun, *Chemosphere*, **54**, 1247–1253 (2004).
- [148] W. Huang, P. Peng, Z. Yu, and J. Fu, *Applied Geochemistry*, **18**, 955–972 (2003).
- [149] C. Chlou, R. Malcolm, T. Brinton, and D. Kille, *Environ. Science Technology*, **20**, 502–508 (1986).
- [150] S. Thiele-Bruhn, T. Seibicke, H. Schuelten, and P. Leinweber, *Journal of Environmental Quality*, **33**, 1331–1342 (2004).
- [151] A. Aquino, D. Tunega, G. Haberhauer, M. Gerzabek, and H. Lischka, *Journal of Computational Chemistry*, **24**, 1853–1863 (2003).
- [152] W. Kiflom, S. Wandiga, P. Ñgángá, and G. Kamau, *Environmental International*, **25** (4), 479–487 (1999).

- [153] S. Hawthorne, E. Björklund, S. Bowadt, and L. Mathiasson, *Environmental Science Technology*, **33**, 3152–3159 (1999).
- [154] J. Dec and J. Bollag, *Soil Science*, **162**, 858–874 (1997).
- [155] F. Kopinke, J. Pörschmann, and U. Stottmeister, *Environmental Science Technology*, **29**, 941–950 (1995).
- [156] V. Pino, A. Ayala, J.H. and Afonso, and V. González, *Analytica Chimica Acta*, **477**, 81–91 (2003).
- [157] M. Torres Padrón, Z. Sosa Ferrera, and J. J. Santana Rodríguez, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **386**, 332–340 (2006).
- [158] M. Dalla Valle, E. Jurando, J. Dachs, A. Sweetman, and K. Jones, *Environmental Pollution*, **134**, 153–164 (2005).
- [159] E. Jurado, F. Jaward, R. Lohmann, K. Jones, R. Simó, and J. Dachs, *Environmental Science Technology*, **39**, 2426–2435 (2005).
- [160] F. Carvalho, J. Villeneuve, and C. Cattini, *Trends in Analytical Chemistry*, **18 (11)**, 656–664 (1999).
- [161] R. Yang, Z. Yao, G. Jiang, Q. Zhou, and J. Liu, *Marine Pollution Bulletin*, **48**, 795–805 (2004).
- [162] D. Vega Moreno, Z. Sosa Ferrera, and J. J. Santana Rodríguez, *Analytica Chimica Acta*, **571**, 51–57 (2006).
- [163] N. Xue, D. Zhang, and X. Xu, *Water Research*, **40**, 183–194 (2006).

VI

Anexos

Cromatografía

A.1. Introducción

La separación y posterior determinación de los analitos que se estudian en esta tesis se ha llevado a cabo mediante la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) utilizando un detector de diodos.

Para optimizar la separación de los compuestos en estudio de manera que permita una correcta identificación y su posterior cuantificación es necesaria la determinación de los parámetros exclusivamente cromatográficos: tipo de columna cromatográfica, composición de la fase móvil, velocidad de flujo ($\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$), aplicación o no de gradientes de composición y/o flujo y temperatura. En este caso, puesto que la familia de compuestos con que se ha trabajado es principalmente apolar, se optó por trabajar en cromatografía líquida en fase reversa, por lo que se escogió una columna C_{18} como columna de trabajo.

La detección de los compuestos a analizar se realizó con un detector PDA a la longitud de onda de absorción de radiación UV-VIS más adecuada para cada compuesto.

En cuanto a la fase móvil empleada, se utilizó una proporción isocrática de Metanol-Agua (85:15) con un flujo de $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

A continuación se muestran las condiciones más adecuadas para la separación y detección de los pesticidas organoclorados estudiados.

A.2. Condiciones cromatográficas para suelos

Para la determinación de los pesticidas organoclorados en suelos agrícolas se utilizó una columna C_{18} , $250 \times 4.6 \text{ mm}$ (con relleno de partículas de $8 \mu\text{m}$). La separación y determinación de los compuestos bajo estudio se llevó a cabo inyectando $30 \mu\text{l}$ de extracto en el cromatógrafo líquido y se midió la absorbancia de cada analito, correspondiente a la longitud de onda máxima. El tiempo de retención y la longitud de onda para cada compuesto se enumeran en la Tabla A.1.

El cromatograma obtenido para la mezcla de seis pesticidas utilizando la mezcla cetil como extractante en el proceso MAME, se muestra en la Figura A.1. Se puede observar que la fase móvil usada permite una buena separación de los analitos con cortos tiempo de análisis. Los cromatogramas obtenidos para el resto de surfactantes fueron similares. En el cromatograma se observa que la separación entre picos es suficiente para cuantificar satisfactoriamente los diferentes analitos. Además, la señal del surfactante aparece en los primeros 5 minutos de cromatograma, por lo que no interfiere en los picos de interés.

Nº	Compuesto	λ (nm)	T_R (min)
1	4,4'-DDD	238	8.4
2	Dieldrín	220	9.5
3	4,4'-DDT	238	13.3
4	2,4'-DDT	238	14.7
5	4,4'-DDE	238	16.6
6	Aldrín	220	18.1

Tabla A.1: Lista de pesticidas organoclorados, longitudes de onda y tiempos de retención

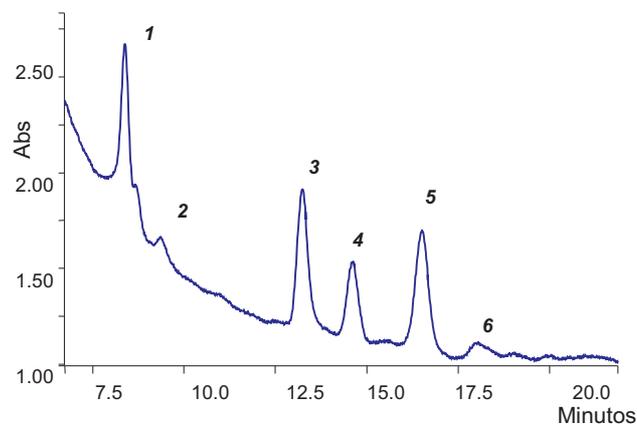


Figura A.1: Cromatograma del extracto de suelo de Valleseco (mezcla cetil)

A.2.1. Curvas de Calibrado para la cuantificación en MAME

Para la cuantificación de los compuestos en estudio, presentes en los extractos de las muestras de suelo con que se ha trabajado, se establecieron curvas de calibrado para cada analito en cada uno de los surfactantes utilizados. Debido a que los pesticidas organoclorados presentan diferentes absorbancias en función de la naturaleza de la disolución en que estén inmersos, se realizaron tantas curvas de calibrado como extractantes empleados.

A continuación (Tabla A.2) se muestran los intervalos de concentración empleados en cada caso así como los parámetros de las ecuaciones empleadas en la cuantificación de los analitos del surfactante POLE (5 %,v/v), siendo la ecuación de la forma: $Y = AX + B$, donde Y es el valor de absorbancia obtenido, X la concentración, A la pendiente, B la ordenada en el origen y R^2 el coeficiente de correlación lineal. Sólo se han especificado los parámetros de uno de los surfactantes a nivel indicativo; con el resto se obtuvieron valores muy similares.

Compuesto	Int. Concent. (ng·ml ⁻¹)	A (pendiente)	B (ord.origen)	R ² (c.c.lineal)
4,4'-DDD	100-1000	368.63	-1147.8	0.9999
Dieldrín	100-1000	117.40	-1522.7	0.9982
4,4'-DDT	100-1000	435.59	2056.4	0.9999
2,4'-DDT	100-1000	290.21	6473.6	0.9996
4,4'-DDE	100-1000	460.36	597.11	0.9993
Aldrín	100-1000	76.96	1774.8	0.9972

Tabla A.2: Parámetros de las curvas de calibrado obtenidos utilizando POLE como extractante en el proceso MAME

A.2.2. Curvas de Calibrado para MAME-SPME

Las curvas de calibrado se realizaron para el proceso MAME-SPME utilizando POLE (5 %,v/v) como extractante, una fibra SPME 60 μm PDMS-DVB y volumen de desorción 80 μl de metanol, de los que se inyectaron en el cromatógrafo líquido 50 μl . Las curvas de calibrado en el proceso MAME-SPME se realizaron de forma interna, para poder incluir en ellas el factor de preconcentración que produce la SPME.

Sólo se han especificado los parámetros de uno de los surfactantes a nivel indicativo, con la Mezcla Stearil se obtuvieron valores muy similares.

En la Tabla A.3 se muestran los intervalos de concentración empleados en cada caso, así como los parámetros de las ecuaciones empleadas en la cuantificación de los analitos: A pendiente, B ordenada en el origen y R^2 coeficiente de correlación lineal.

Compuesto	Int. Concent. ($\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$)	A (pendiente)	B (ord.origen)	R^2 (c.c.lineal)
4,4'-DDD	50-500	174.98	1812.7	0.9927
Dieldrín	50-500	66.51	-1624.1	0.9913
4,4'-DDT	50-500	181.87	1880.9	0.9975
2,4'-DDT	50-500	112.33	1595.6	0.9958
4,4'-DDE	50-500	228.90	4215.4	0.9906

Tabla A.3: Parámetros de las curvas de calibrado obtenidos en el proceso MAME-SPME utilizando POLE como extractante y la fibra SPME 60 μm PDMS-DVB

A.3. Condiciones cromatográficas para fangos

Al finalizar el estudio de suelos se adquirió una nueva columna cromatográfica para el resto de matrices a analizar. La columna utilizada a partir del estudio de fangos fue una columna C₁₈, 150x4.6 mm (con relleno de partículas de 4 μm). Es una columna de la misma composición que la anterior, pero con diferente tamaño de partícula interna y de menor longitud, lo que permite identificar y cuantificar los compuestos en menor tiempo.

La fase móvil empleada para esta columna fue Metanol-Agua (84:16) con un flujo isocrático de 1 ml·min⁻¹.

La separación y determinación de los compuestos bajo estudio se llevó a cabo inyectando 50 μl de extracto en el cromatógrafo líquido y se midió la absorbancia de cada analito, correspondiente a la máxima absorbancia. El tiempo de retención y la longitud de onda para cada compuesto se enumeran en la Tabla A.4.

Nº	Compuesto	λ (nm)	T _R (min)
1	4,4'-DDD	238	5.4
2	Dieldrín	220	6.1
3	4,4'-DDT	238	8.7
4	2,4'-DDT	238	9.6
5	4,4'-DDE	238	10.9
6	Aldrín	220	11.9

Tabla A.4: Lista de pesticidas organoclorados, longitudes de onda y tiempos de retención

El cromatograma obtenido para la mezcla de seis pesticidas utilizando POLE como extractante acoplado a una fibra de SPME 60 μm PDMS-DVB, se muestra en la Figura A.2. En el cromatograma se observa que la separación entre picos es suficiente para cuantificar satisfactoriamente los diferentes analitos. Con el método de extracción MAME-SPME optimizado se obtienen picos más definidos e intensos que si se inyectase directamente el extracto MAME. Además, se elimina la señal producida por el surfactante, obteniendo una mejor línea base.

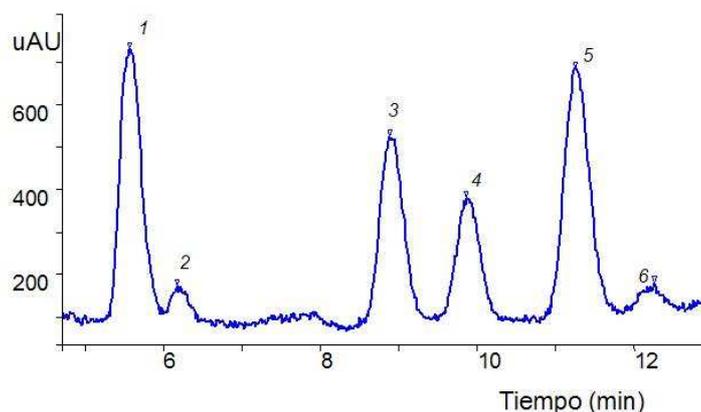


Figura A.2: Cromatograma del extracto de fango de Hoya Pozuelo utilizando MAME-SPME

A.3.1. Curvas de Calibrado para MAME-SPME

Las curvas de calibrado se realizaron para el proceso MAME-SPME utilizando POLE (5 %,v/v) como extractante, una fibra SPME 60 μm PDMS-DVB y volumen de desorción 55 μl de metanol, de los que se inyectaron en el cromatógrafo líquido 50 μl . Las curvas de calibrado en el proceso MAME-SPME se realizaron de forma interna, para poder incluir en ellas el factor de preconcentración que produce la SPME.

En la Tabla A.5 se muestran los intervalos de concentración empleados en cada caso, así como los parámetros de las ecuaciones empleadas en la cuantificación de los analitos: A pendiente, B ordenada en el origen y R^2 coeficiente de correlación lineal.

Compuesto	Int. Concent. (ng·ml ⁻¹)	A (pendiente)	B (ord.origen)	R ² (c.c.lineal)
4,4'-DDD	50-500	302.73	2326.7	0.9976
Dieldrín	100-1000	73.09	4593.5	0.9929
4,4'-DDT	50-500	303.38	377.67	0.9949
2,4'-DDT	50-500	203.92	-1753.6	0.9972
4,4'-DDE	50-500	387.63	-2797.1	0.9997
Aldrín	100-1000	73.66	-2992.6	0.9944

Tabla A.5: Parámetros de las curvas de calibrado obtenidos en el proceso MAME-SPME utilizando POLE como extractante y la fibra SPME 60 μm PDMS-DVB

A.4. Condiciones cromatográficas para algas

La determinación de algas se realizó con la misma columna que para fangos, una columna C₁₈, 150x4.6 mm (con relleno de partículas de 4 μm). La fase móvil empleada para esta columna fue Metanol-Agua (84:16) con un flujo isocrático de 1 ml·min⁻¹.

La separación y determinación de los compuestos bajo estudio se llevó a cabo inyectando 50 μl de extracto en el cromatógrafo líquido y se midió la absorbancia

de cada analito, correspondiente a la longitud de onda máxima. El tiempo de retención y la longitud de onda para cada compuesto se enumeran en la Tabla A.4.

El cromatograma obtenido para la mezcla de seis pesticidas utilizando POLE como extractante y el cartucho SPE Envirelut-Pesticide 500mg, se muestra en la Figura A.3.

En el cromatograma se observa que la separación entre picos es suficiente para cuantificar satisfactoriamente los diferentes analitos. Con el método de extracción MAME-SPE optimizado se obtienen picos mucho más definidos e intensos que si se inyectase directamente el extracto MAME, o incluso que con el método MAME-SPME. Además, se elimina la señal producida por el surfactante y por las interferencias de la matriz, obteniendo una mejor línea base.

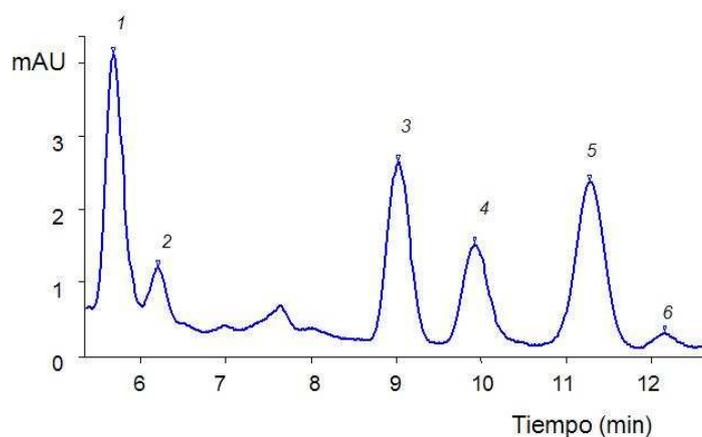


Figura A.3: Cromatograma del extracto de alga de *Ulva rigida* utilizando MAME-SPE

A.4.1. Curvas de Calibrado para MAME-SPME

Las curvas de calibrado se realizaron para el proceso MAME-SPME utilizando POLE (5 %,v/v) como extractante, una fibra SPME 60 μm PDMS-DVB y volumen de desorción 55 μl de metanol, de los que se inyectaron en el cromatógrafo líquido 50 μl . Las curvas de calibrado en el proceso MAME-SPME se realizaron de forma interna, para poder incluir en ellas el factor de preconcentración que produce la SPME.

En la Tabla A.6 se muestran los intervalos de concentración empleados en cada caso, así como los parámetros de las ecuaciones empleadas en la cuantificación de los analitos: A pendiente, B ordenada en el origen y R^2 coeficiente de correlación lineal.

Compuesto	Int. Concent. ($\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$)	A (pendiente)	B (ord.origen)	R^2 (c.c.lineal)
4,4'-DDD	50-500	285.75	856.65	0.9984
Dieldrín	100-1000	72.78	-1200.3	0.9963
4,4'-DDT	50-500	336.02	-3197.2	0.9990
2,4'-DDT	50-500	186.96	-2958.4	0.9992
4,4'-DDE	50-500	397.89	-6110.5	0.9991
Aldrín	100-1000	51.83	2194.4	0.9955

Tabla A.6: Parámetros de las curvas de calibrado obtenidos en el proceso MAME-SPME utilizando POLE como extractante y la fibra SPME 60 μm PDMS-DVB

A.4.2. Curvas de Calibrado para MAME-SPE

Las curvas de calibrado se realizaron para el proceso MAME-SPE utilizando POLE (5 %,v/v) como extractante, un cartucho SPE Envirelut-Pesticide 500 mg, un volumen de desorción 2 ml y un volumen de inyección en el sistema HPLC-UV de 50 μ l. Las curvas de calibrado en el proceso MAME-SPE se realizaron de forma interna, para poder incluir en ellas el factor de preconcentración que produce la SPE.

En la Tabla A.7 se muestran los intervalos de concentración empleados en cada caso, así como los parámetros de las ecuaciones empleadas en la cuantificación de los analitos: A pendiente, B ordenada en el origen y R^2 coeficiente de correlación lineal.

Compuesto	Int. Concent. (ng·ml ⁻¹)	A (pendiente)	B (ord.origen)	R ² (c.c.lineal)
4,4'-DDD	10-400	1584.60	10214.0	0.9968
Dieldrín	20-800	642.66	-5558.0	0.9940
4,4'-DDT	10-400	1931.8	-5547.7	0.9961
2,4'-DDT	10-400	1173.6	-1017.9	0.9948
4,4'-DDE	10-400	1739.1	-1874.9	0.9951
Aldrín	20-800	356.46	1312.6	0.9961

Tabla A.7: Parámetros de las curvas de calibrado obtenidos en el proceso MAME-SPE utilizando POLE como extractante y el cartucho SPE Envirelut-Pesticide 500mg para algas

A.4.3. Análisis de extractos Soxhlet

Las condiciones empleadas para la determinación cromatográfica de los pesticidas organoclorados fueron las mismas que para los extractos MAME, MAME-SPME o MAME-SPE. Los tiempos de retención obtenidos y las longitudes de onda empleadas son por lo tanto coincidentes con las que se muestran en la Tabla A.4.

Las curvas de calibrado se realizaron para el proceso Soxhlet de forma externa en metanol, inyectando 50 μl en el sistema HPLC-UV. Los intervalos de concentración utilizados fueron de 50-500 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ para la familia del DDT y de 100-1000 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ para el Aldrín y Dieldrín; los coeficientes de correlación lineal fueron en todos los casos superiores a 0.999.

A.5. Condiciones cromatográficas para moluscos

La determinación de los moluscos se realizó con la misma columna que para fangos y algas, una columna C_{18} , 150x4.6 mm (con relleno de partículas de 4 μm). La fase móvil empleada para esta columna fue Metanol-Agua (84:16) con un flujo isocrático de 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

La separación y determinación de los compuestos bajo estudio se llevó a cabo inyectando 50 μl de extracto en el cromatógrafo líquido y se midió la absorbancia de cada analito, correspondiente a la longitud de onda máxima. El tiempo de retención y la longitud de onda para cada compuesto se enumeran en la Tabla A.4.

El cromatograma obtenido para la mezcla de seis pesticidas organoclorados utilizando POLE como extractante y el cartucho SPE Envirelut-Pesticide 500 mg, se muestra en la Figura A.4.

En el cromatograma se observa que la separación entre picos es suficiente para determinar satisfactoriamente los diferentes analitos. Con el método de extracción MAME-SPE optimizado se obtienen picos mucho más definidos e intensos que si se inyectase directamente el extracto MAME, y además se eliminan las interferencias y proteínas que causarían daños en la columna cromatográfica. La cola producida en el pico 4 (2,4'-DDT) es debido a interferencias con la matriz, pero no perjudica en la cuantificación del analito.

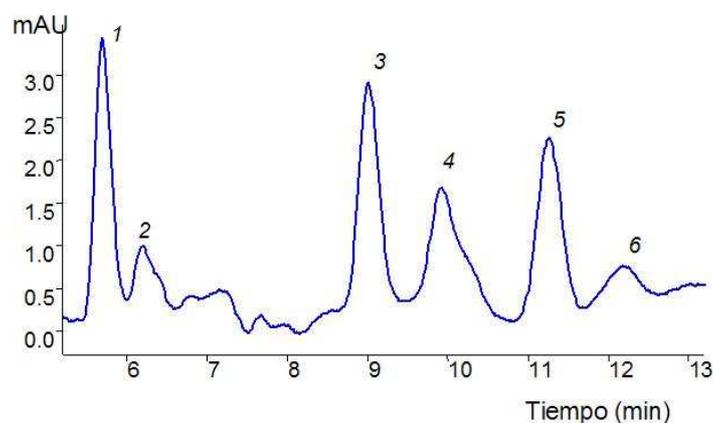


Figura A.4: Cromatograma del extracto de mejillón utilizando MAME-SPE

Se aplicaron las curvas de calibrado obtenidas en el proceso MAME-SPE para algas (Tabla A.7), porque los parámetros utilizados eran idénticos: POLE (5%,v/v) como extractante, cartucho SPE Envirelut-Pesticide 500 mg, volumen de desorción 2 ml y 50 μ l de volumen de inyección en el sistema HPLC-UV. Las curvas de calibrado se realizaron de forma interna, para poder incluir en ellas el factor de preconcentración que produce la SPE.

Publicaciones y Congresos

Los estudios realizados en la presente Tesis Doctoral han dado lugar a las siguientes publicaciones y comunicaciones a congresos:

B.1. Publicaciones

- Use of Polyoxyethylene surfactants for the extraction of organochlorine pesticides from agricultural soils.

D. Vega Moreno, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodríguez

Journal of Chromatography A **1104** (2006) 11-17

- Microwave assisted micellar extraction coupled with solid phase microextraction for the determination of organochlorine pesticides in soil samples.

D. Vega Moreno, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodríguez

Analytica Chimica Acta **571**(2006) 51-57

- Sample extraction method combining Micellar Extraction-SPME and HPLC for the determination of organochlorine pesticides in agricultural soils.

D. Vega Moreno, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodríguez

Journal of Agricultural and Food Chemistry **54** (2006) 7747-7752

- Application of microwave assisted micellar extraction combined with solid phase microextraction and HPLC-UV for the determination of organochlorine pesticides in different mud samples.

D. Vega Moreno, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodríguez

International Journal of Environmental Analytical Chemistry, *aceptado*

- SPME and SPE comparative study for coupling with microwave-assisted micellar extraction in the analysis of organochlorine pesticides residues in seaweed samples.

D. Vega Moreno, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodríguez

Microchemical Journal, *aceptado (MICROC-00862)*

- Extraction of organochlorine pesticides from agricultural spiked soils using microwave assisted extraction with surfactants prior their determination by HPLC.

D. Vega Moreno, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodríguez

Journal of Chromatographic Sciences, *enviado*

- Analysis of organochlorine pesticides in mollusc samples by HPLC after microwave assisted micellar extraction coupled with solid phase extraction.

D. Vega Moreno, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodríguez

Journal of Liquid Chromatography & Related Techniques, *enviado*

B.2. Comunicaciones a Congresos

- Microwave assisted extraction of organochlorine pesticides from soils using non-ionic surfactant solution.

D. Vega Moreno, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodríguez.

5th European Meeting on Environmental. Bari (Italia). Diciembre 2004.

- Application of microwave assisted micellar extraction and hplc to the determination of pesticides in agricultural soil samples.

D. Vega Moreno, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodríguez.

29th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques / HPLC 2005. Estocolmo (Suecia). Junio 2005.

- Chromatographic determination of organochlorine pesticides in soils after microwave assisted micellar extraction.

D. Vega Moreno, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodríguez.

I Congreso Internacional de Química Analítica Aplicada. Lima (Perú). Septiembre 2005.

- Coupling microwave assisted micellar extraction and SPME for the determination of pesticides in soils.

D. Vega Moreno, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodríguez.

11^a Jornadas de Análisis Instrumental. Barcelona (España). Noviembre 2005.

- Sample extraction method combining MAME-SPME and HPLC for the determination of pesticides in environmental solid samples.

D. Vega Moreno, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodríguez.

12th Symposium on Sample Handling for Environmental and Biological Analysis. Zaragoza (España). Octubre 2006.

- Microwave assisted micellar extraction as alternative methodology for the extraction of organochlorine and organophosphorous pesticides in solid samples.

D. Vega Moreno, C. Padrón Sanz, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodríguez.

VI Congreso Internacional de Química de la ANQUE: Química y Desarrollo Sostenible. Tenerife (España). Diciembre 2006.

- Green extraction methods for the determination of organochlorine and organophosphorus pesticides in environmental marine samples.

D. Vega Moreno, C. Padrón Sanz, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodríguez.

Simposio Internacional de Ciencias del Mar / Simposio GLOBEC-IMBER España. Valencia (España). Marzo 2007.

- A new analytical method combining microwave assisted micellar extraction followed by solid phase microextraction for the determination of organochlorine pesticides in mud samples.

D. Vega Moreno, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodríguez.

31th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques / HPLC 2007. Gante (Bélgica). Junio 2007.

- Clean-up in microwave assisted micellar extraction using SPME for the chromatographic analysis of organochlorine pesticides in seaweed samples.

D. Vega Moreno, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodríguez.

13th International Symposium on Separation Sciences. Štrbské Pleso (Eslovaquia). Junio 2007.

- Establishment of a green method combining microwave assisted micellar extraction and SPE for the determination of organochlorine pesticides in seaweeds.

D. Vega Moreno, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodríguez.

EUROanalysisXIV. Antwerp (Bélgica). Septiembre 2007.

- Combination of microwave assisted micellar extraction with a clean-up step by SPE and HPLC for the determination of organochlorine pesticides in mollusc samples.

D. Vega Moreno, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodríguez.

IX International Symposium on Analytical Methodology in the Environmental Field. Mallorca (España). Octubre 2007.