



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA  
Departamento de Química

TESIS DOCTORAL

EXTRACCIÓN MICELAR DE COMPUESTOS ORGANO-  
CLORADOS Y ORGANOFOSFORADOS. APLICACIÓN A SU  
DETERMINACIÓN POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA EN  
MUESTRAS MEDIOAMBIENTALES

CAROLINA PADRÓN SANZ  
2005



# **INDICE DE CONTENIDO**



<b>I INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
<b>I.1 DIOXINAS -----</b>	<b>5</b>
<b>I.2 PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS-----</b>	<b>14</b>
<b>I.3 SURFACTANTES -----</b>	<b>22</b>
<b>I.4 OBJETIVOS-----</b>	<b>33</b>
<b>I.5 BIBLIOGRAFÍA-----</b>	<b>37</b>
<b>II MATRICES LÍQUIDAS .....</b>	<b>43</b>
<b>II.1 INTRODUCCIÓN -----</b>	<b>45</b>
II.1.1 Técnicas de extracción en matrices líquidas. ....	45
II.2.2 Surfactantes como alternativa (CPE) ..	48
<b>II.2 CARACTERIZACIÓN DE SURFACTANTES -----</b>	<b>62</b>
II.2.1 Temperatura de <i>punto de nube</i> . Diagrama de Fases.....	62
II.2.2 Relación de fases. Factor de preconcentración. ....	64
<b>II.3 EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE DIOXINAS POLICLORADAS -----</b>	<b>67</b>
II.3.1 Optimización de la extracción de dioxinas en agua .....	67
II.3.2 Parámetros analíticos y Validación del método.....	73
II.3.3 Aplicación a otras muestras acuosas .....	78
<b>II.4 EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS</b>	<b>83</b>
II.4.1 Optimización de la extracción de pesticidas organofosforados en agua .....	83
II.4.2 Parámetros analíticos y Validación del método.....	88
II.4.3 Aplicación a otras muestras acuosas .....	93
<b>II.5 BIBLIOGRAFÍA-----</b>	<b>96</b>

<b>III MATRICES SÓLIDAS .....</b>	<b>101</b>
<i>III.1 INTRODUCCIÓN-----</i>	<i>103</i>
II.1.1 Técnicas de extracción en matrices sólidas. ....	103
II.2.2 Surfactantes como alternativa (MAME) .....	107
<i>III.2 EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE DIOXINAS POLICLORADAS -----</i>	<i>116</i>
III.2.1 Optimización de la extracción de dioxinas de sedimentos marinos .....	116
III.2.2 Parámetros analíticos y Validación del método.....	125
III.2.3 Aplicación a otras muestras sólidas .....	128
<i>III.3 EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS</i>	
<i>-----</i>	<i>132</i>
III.3.1.1 Optimización de la extracción de pesticidas organofosforados en suelo .	132
III.3.1.2 Parámetros analíticos y Validación del método.....	139
III.3.1.3 Aplicación a otras muestras sólidas .....	143
III.3.2.1 Optimización de la extracción de pesticidas organofosforados en tomate	150
III.3.2.2 Parámetros analíticos y Validación del método.....	155
III.3.2.3 Aplicación a otros vegetales .....	160
<i>III.4 BIBLIOGRAFÍA -----</i>	<i>163</i>
<b>IV EXPERIMENTAL .....</b>	<b>169</b>
<i>IV.1 REACTIVOS Y DISOLUCIONES -----</i>	<i>171</i>
<i>IV.2 APARATOS -----</i>	<i>173</i>
<i>IV.3 PROCEDIMIENTOS -----</i>	<i>175</i>

<b>V CONCLUSIONES .....</b>	<b>183</b>
<i>V.1 CONCLUSIONES -----</i>	<i>185</i>
<i>V.2 ESTUDIOS FUTUROS-----</i>	<i>188</i>
<b>ANEXO I CROMATOGRAFÍA .....</b>	<b>189</b>
1 <i>INTRODUCCIÓN-----</i>	<i>191</i>
2 <i>CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE DIBENZO-P-</i>	
<i>DIOXINAS -----</i>	<i>192</i>
3 <i>CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS</i>	
<i>ORGANOFOSFORADOS-----</i>	<i>200</i>
<b>ANEXO II PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES .....</b>	<b>203</b>





# **CAPÍTULO I.- INTRODUCCIÓN**



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.

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

Durante el siglo XX, la creciente sensibilización respecto al impacto de las actividades humanas en el medio ambiente ha dado lugar al desarrollo y utilización de diferentes métodos de análisis y tecnologías para reducir o controlar la contaminación ambiental.

Sin embargo, el análisis en muestras medioambientales es bastante costoso porque requiere la extracción de un gran número de contaminantes, generalmente presentes en muestras muy complejas (p.e. tejidos de

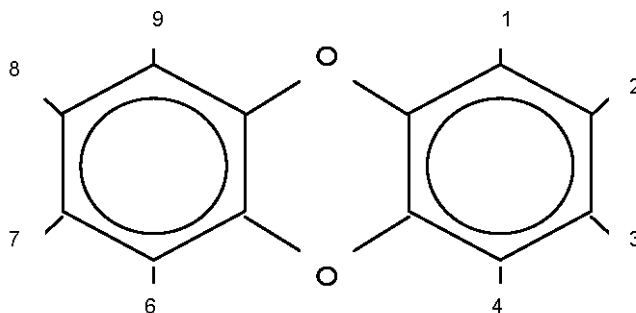
organismos), o bien porque tales compuestos se encuentran fuertemente adheridos a la matriz, o bien porque se encuentran en concentraciones extremadamente bajas (como es el caso del análisis en muestras acuosas marinas). Por lo que se precisa de una mayor investigación y desarrollo de técnicas de análisis que consigan determinar el mayor número de sustancias tóxicas, en la menor concentración posible, de forma rápida, sencilla y en la medida de lo posible sin agredir al medio ambiente.

En este sentido, la presente Tesis Doctoral, pretende contribuir y apoyar dicha línea de investigación con la propuesta de nuevas técnicas “limpias” para el análisis de contaminantes como las dioxinas policloradas y pesticidas organofosforados, en muestras medioambientales.

## 1.1 DIOXINAS

Las dibenzo-p-dioxinas (PCDDs) son compuestos aromáticos tricíclicos clorados que son emitidos al medioambiente como subproductos derivados de diversos procesos antropogénicos y responden a una estructura de tipo:

Figura 1.- Estructura general de las dibenzo-p-dioxinas.



Los átomos de cloro pueden sustituir alguna o todas las posiciones enumeradas anteriormente, con lo que pueden aparecer 75 isómeros diferentes. Estas sustancias son químicamente estables y por lo tanto altamente persistentes en el medioambiente, siendo más persistentes a medida que aumenta el número de átomos de cloro en la molécula; tienen baja solubilidad en agua y se acumulan en la cadena alimentaria (1). Por ello, el impacto de estos compuestos en el medio ambiente es un tema de gran interés debido a la alta toxicidad que presentan.

Las dibenzo-p-dioxinas son compuestos orgánicos sin ninguna aplicación industrial, por lo que, salvo en pequeñas concentraciones para investigación, nunca han sido sintetizadas. Su formación y entrada al medioambiente es debida bien a la síntesis de compuestos organoclorados (como clorofenoles o pesticidas), en los que las dioxinas aparecen como subproductos, o bien, a la combustión de materia orgánica en presencia de cloro, por lo que se asocian

fundamentalmente a las plantas incineradoras de residuos urbanos o industriales.

Las principales fuentes de dioxinas en España y Europa occidental son, precisamente, las plantas incineradoras de residuos y las industrias de reciclaje de metal (2). Otras fuentes que fueron muy importantes hace varios años han sido drásticamente reducidas, como es el caso de las emisiones de las papeleras industriales y el uso de clorofenoles y de herbicidas organoclorados, como por ejemplo el agente naranja. En España no existen datos de las tendencias temporales de los niveles de dioxinas; sin embargo, los datos disponibles de países del norte y noroeste de Europa indican que la exposición humana a las dioxinas se incrementó durante este siglo hasta los años setenta y ochenta, para posteriormente disminuir, primero con el control de las emisiones de las papeleras y la prohibición del uso de herbicidas, y después con el control de las emisiones de las incineradoras de residuos urbanos, hospitalarios e industriales (3).

En la Tabla I.1 se muestra la serie de dioxinas con que se ha trabajado en esta Tesis, así como algunos de los parámetros característicos de las mismas.

Las dioxinas son bastante insolubles en agua hecho que se observa por los elevados coeficientes de reparto octanol-agua ( $K_{ow}$ ) que presentan, lo que explica que una vez en el medio se adsorban con facilidad sobre el material particulado y se retengan fuertemente en los tejidos adiposos de los organismos. Además, se aprecia que esta propiedad aumenta a medida que aumenta el grado de sustitución por átomos de cloro en la molécula. Esto es importante también para predecir su transporte atmosférico, siendo menos volátiles a medida que aumenta su grado de cloración. Asimismo, la notable estabilidad química de dichas sustancias frente a otros compuestos fuertemente oxidantes, reductores, ácidos o básicos explica que experimenten transportes en el aire

hasta largas distancias sin modificar su estructura química, sobre todo en el caso de las dioxinas más cloradas.

Tabla I.1.- Dibenzo-p-dioxinas estudiadas.

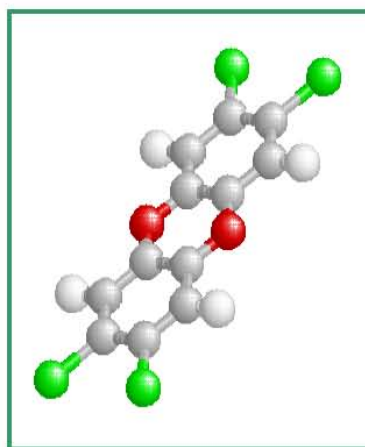
Nº y posición de los átomos de cloro en las PCDDs	Código	Peso molecular	Presión de vapor -log P (Pa) <sup>a</sup>	Solubilidad en agua -log S (mol/l) <sup>a</sup>	Reparto octanol/agua log Kow <sup>a</sup>
Dibenzo-p-dioxin (DD)	1DD	184	0.29	4.36	4.20
1-DD	2DD	218	1.12	4.92	4.75
2,3-DD	3DD	252	2.03	5.86	5.80 <sup>b</sup>
2,3,7-DD	4DD	286	3.67 <sup>b</sup>	6.63 <sup>b</sup>	6.46 <sup>b</sup>
2,3,7,8-DD	5DD	321,96	3.93	7.45	7.06 <sup>b</sup>
1,2,3,7,8-DD	6DD	356,4	5.38 <sup>b</sup>	7.95 <sup>b</sup>	7.55 <sup>b</sup>
1,2,3,6,7,8-DD	7DD	390,84	6.07 <sup>b</sup>	8.55 <sup>b</sup>	7.95 <sup>b</sup>
1,2,3,4,6,7,8-DD	8DD	422	6.22	8.86	8.20
1,2,3,4,6,7,8,9-DD	9DD	460	6.73	9.85	8.60

<sup>a</sup> Valores experimentales (4)

<sup>b</sup> Valores predichos por el modelo matemático GC-IR (5)

Por otra parte, el número y la posición de los átomos de cloro en la molécula determinan el carácter tóxico de la misma. Los congéneres que tienen de uno a tres sustituyentes no presentan apenas toxicidad, frente a aquellos con un número mayor de átomos de cloro. Adicionalmente, los homólogos más tóxicos son los que tienen los átomos de cloro en las posiciones 2,3,7,8. Concretamente la 2,3,7,8 Tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) es la más tóxica.

Las dibenzo-p-dioxinas policloradas (PCDDs) están muy estrechamente relacionadas, tanto química como toxicológicamente, con el grupo de dibenzofuranos policlorados (PCDFs) y algunos bifenilos policlorados (PCBs).

**Figura I.2.-Estereoquímica de la TCDD**

Para hablar del grado de toxicidad relativa de estos compuestos se ha establecido un algoritmo internacional que emplea el "factor de toxicidad equivalente" (TEF), que pertenece a una escala relativa en la que al compuesto más tóxico, la TCDD, se le asigna el valor de 1 y que permite calcular los equivalentes de toxicidad (TEQ) multiplicando por su concentración.

TEF= factor de equivalencia tóxica (toxic equivalent factor)

TEQ= C x TEF (Donde C es la concentración de la sustancia)

En la Tabla I.2 se muestran los factores de equivalencia tóxica para las dioxinas.

La International Agency of Research on Cancer (IARC) es la agencia especializada de la Organización Mundial de la Salud (OMS) que realiza las evaluaciones de los agentes cancerígenos. Dichas evaluaciones acaban clasificando los agentes en cinco categorías:

1 (cancerígeno humano)

2 A (probablemente cancerígeno)



2 B (posiblemente cancerígeno)

3 (evidencias inadecuadas/ no concluyentes)

4 (evidencias que indican que no es cancerígeno)

Las dioxinas estaban, en un principio, incluidas en la categoría 2 B, pero en la reevaluación de 1997 se clasificaron en la categoría 1 (2).

Tabla I.2.\_ Factores de equivalencia tóxica para dibenzo-p-dioxinas policloradas. (6)

Nº y posición de los átomos de cloro en las PCDDs	TEF
2,3,7,8	1
1,2,3,7,8	0.5
1,2,3,4,7,8	0.1
1,2,3,6,7,8	0.1
1,2,3,7,8,9	0.1
1,2,3,4,6,7,8	0.01
1,2,3,4,6,7,8,9	0.001

Las dioxinas están ampliamente distribuidas y pueden encontrarse en diferentes medios (7-9). Los compuestos policlorados producidos durante los diferentes procesos de combustión pasan principalmente a la atmósfera desde donde son transportados a los medios acuático y terrestre. Debido a sus propiedades hidrofóbicas y lipofílicas se adsorben fuertemente al material orgánico presente en el medio, lo que permite que sean ingeridos por los organismos y pasen a formar parte de la cadena trófica donde se produce la acumulación de los mismos. Excluyendo las exposiciones ocupacionales o las

accidentales, la mayor parte de la exposición humana a las dioxinas se limita casi exclusivamente a la dieta (95%) (10, 11). Particularmente se encuentran en la leche y en los productos lácteos, en el pescado y en la carne, es decir, en todo tipo de alimentos que contengan altas proporciones de lípidos (12-14).

Para conseguir un mayor control y reducción de la exposición humana a las dioxinas, la Unión Europea ha propuesto, entre otras medidas, establecer límites de emisión de dioxinas para las principales fuentes industriales (15) así como los niveles máximos de dioxinas y dibenzofuranos permitidos en determinados productos de consumo Tabla I.3.

En la mayoría de los países, las regulaciones relacionadas con la liberación de dioxinas en las incineradoras ya se han adaptado a las directivas correspondientes. Sin embargo, ningún Estado miembro ha introducido los requisitos legales de la legislación europea sobre la liberación de dioxinas en el agua.

La Región Autónoma de Canarias, posee una situación y unas características por las cuales el estudio de estos compuestos es de especial interés. Un interés tanto social como económico y sanitario.

Como se ha mencionado en los apartados anteriores, las dioxinas que han sido objeto de este estudio son compuestos altamente tóxicos y por ello sometidos a una cierta regulación y/o control en algunos casos. Atendiendo pues a las diferentes normativas europeas para el control de estas sustancias, estamos en la obligación de aplicar distintas metodologías, e incluso de ofrecer y desarrollar alternativas a las ya existentes, para el análisis de estas sustancias tóxicas en muestras de diferente naturaleza.

**Tabla I.3.-** Niveles máximos de dioxinas (suma de PCDDs y PCDFs expresado en los tóxicos equivalentes según la Organización Mundial de la Salud, que emplea los factores de toxicidad equivalentes de 1997) (16).

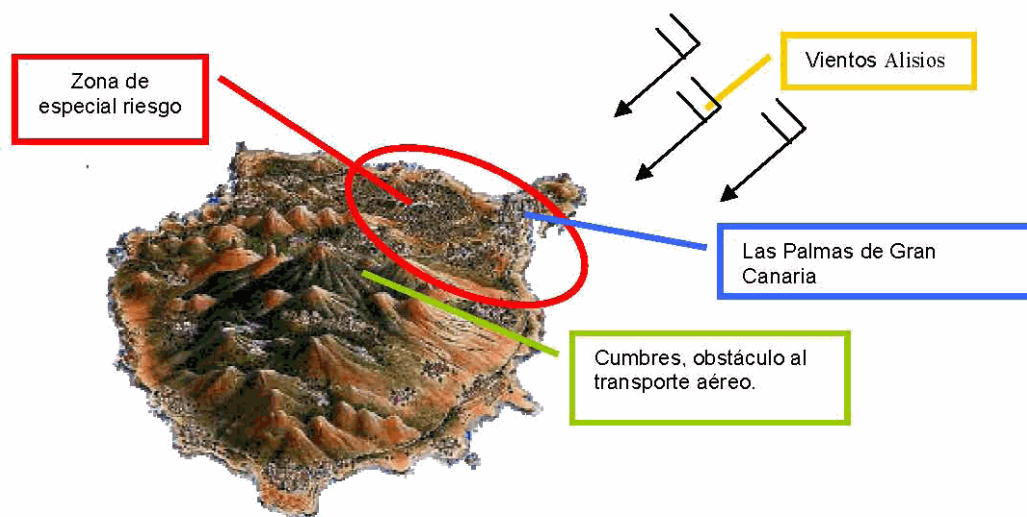
Productos	Niveles máximos (PCDD + PCDF) (*) (pg WHO-PCDD/F-TEQ/g grasa o producto)
Carne y productos cárnicos derivados de	
- rumiantes (ganado ovino y bovino)	3 pg WHO-PCDD/F-TEQ/g grasa
- aves de corral y de granja	2 pg WHO-PCDD/F-TEQ/g grasa
- cerdos	1 pg WHO-PCDD/F-TEQ/g grasa
Hígado y productos derivados	6 pg WHO-PCDD/F-TEQ/g grasa
Carne de pescado, productos de pesquería y derivados de los mismos	4 pg WHO-PCDD/F-TEQ/g peso fresco
Leche y derivados lácteos incluyendo la mantequilla	3 pg WHO-PCDD/F-TEQ/g grasa
Huevos de gallina y derivados	3 pg WHO-PCDD/F-TEQ/g grasa
Aceites y grasas	
*Grasa animal	
- De rumiantes	3 pg WHO-PCDD/F-TEQ/g grasa
- De granja	2 pg WHO-PCDD/F-TEQ/g grasa
- De cerdos	1 pg WHO-PCDD/F-TEQ/g grasa
- Mezclas de grasas animales	2 pg WHO-PCDD/F-TEQ/g grasa
*Aceites vegetales	0.75 pg WHO-PCDD/F-TEQ/g grasa
*Aceite de pescado para consumo humano	2 pg WHO-PCDD/F-TEQ/g grasa

\*Comisión Directiva a ser adoptada antes del 1 de Julio de 2002.

Aunque la tendencia global sea precisamente la instalación de incineradoras como sustituto de los vertederos de residuos urbanos que, como es bien sabido, son una fuente de contaminación aún mayor, en las Islas Canarias dicha instalación es aún mucho más necesaria que en otras regiones, debido precisamente a la limitación del espacio que existe, por lo que en la actualidad está en proyecto la construcción de incineradoras de residuos urbanos. Por ejemplo, en Juan Grande, correspondiente al municipio de Santa Lucía (Sureste de Gran Canaria). Ahora bien, ¿qué ocurre con las incineradoras ya instaladas? (en hospitales fundamentalmente), ¿existe algún tipo de control sobre las sustancias que estas chimeneas están emitiendo a la atmósfera?

El análisis oficial de dioxinas (propuesto por la Agencia de Protección Medioambiental, EPA) requiere un equipamiento altamente costoso y en la actualidad, en España, sólo se realiza en el Consejo Superior de Investigaciones Científicas de Barcelona, concretamente en la Unidad de Espectrometría de Masas, a cargo del grupo de investigación del Prof. Dr. D. Josep Rivera. Son muy pocos los centros públicos o privados españoles que han enviado muestras a este centro para certificar la emisión de gases libres de dioxinas, por lo que se puede considerar que se carece de datos o información acerca del estado de contaminación y por lo tanto del cumplimiento o no de la normativa vigente. Sin embargo, en las Islas Canarias, se da además la particularidad de que los núcleos urbanos más importantes (donde se localizan y donde se instalarán el mayor número de incineradoras) están situados en el NE de las islas y que en esta región, por las latitud en que se localiza, soplan unos vientos altamente persistentes, los vientos alisios, que, por la dirección y sentido en que soplan, arrastrarían cualquier sustancia emitida a la atmósfera hacia el interior de la isla. Y que, por la orografía de la misma, se verían concentradas en una estrecha zona de la isla situada a barlovento (Figura I.3).

**Figura I.3.-** Esquema explicativo de la situación de posible riesgo en cuanto a la contaminación por dioxinas en la isla de Gran Canaria.



Éste es un factor que, por su particularidad, debería ser tenido en cuenta, ya que una emisión no controlada y un transporte persistente hacia una misma zona podrían provocar una exposición más prolongada de lo habitual y hacer de las zonas situadas al NE de las islas, áreas de especial riesgo.

Por ello, el análisis de dioxinas emitidas por las chimeneas, en suelo, agua, animales y vegetales de todas estas zonas, que presumiblemente estarán altamente expuestas, será de especial interés en un futuro muy próximo, ya no sólo por el cumplimiento de la legislación. Sino también por el propio interés que tiene que suscitar el conocimiento del estado de contaminación y prevención del medio, por las consecuencias tan graves, sociales y sanitarias, que se pudieran derivar.

## 1.2 PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (17), un plaguicida es cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladoras del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes...etc. Han adoptado definiciones análogas las Comisión del Codex Alimentarius (18), excluyendo en cada caso los fertilizantes, los nutrientes para plantas o animales, los aditivos alimentarios y los medicamentos de veterinaria.

El uso de plaguicidas se generalizó a partir de la Segunda Guerra Mundial y está estrechamente vinculado con los cambios introducidos en los modelos de producción y cultivo que duplicaron la productividad de la agricultura respecto al resto de la economía. Los plaguicidas por sí solos son responsables de al menos el 30% de ese aumento de producción.

El primer plaguicida utilizado en los años '40, el dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), fue presentado al mundo como la solución para todas las plagas sin efectos negativos para el hombre, e hizo a su descubridor merecedor del Premio Nobel.

Su facilidad de obtención y aplicación, la rapidez de sus resultados y su coste reducido extendieron rápidamente su uso indiscriminado, sin sospechar los efectos negativos sobre los seres vivos y el ambiente, efectos que aún hoy - después de más de 20 años de su prohibición en Suecia y EEUU- persisten. Muy cercanos químicamente al DDT, aparecieron otros compuestos orgánicos sintéticos con cloro en su fórmula, los pesticidas organoclorados.

Sin embargo, debido al uso masivo generalizado, su efectividad comenzó a disminuir en algunos casos y en los años 50 se diseñaron nuevos pesticidas

sintéticos del grupo de los organofosforados y carbamatos que fueron utilizados como suplementos o sustitutos.

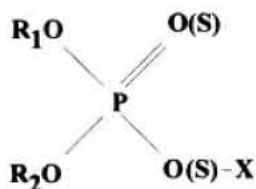
Durante el período entre finales de los años 50 y 60, la investigación en el desarrollo de nuevos pesticidas de los tres grupos principales (organoclorados, organofosforados y carbamatos), así como de las metodologías analíticas para la determinación de sus posibles compuestos precursores, análogos y subproductos, tuvieron lugar rápidamente. A partir del uso de las técnicas analíticas más sofisticadas desarrolladas a lo largo de este periodo, emergieron cuestiones concernientes a la seguridad-peligrosidad de los residuos de pesticidas que quedaban en el ambiente y que llevaron esencialmente a la completa restricción del uso de pesticidas organoclorados en el mundo occidental y su consiguiente sustitución por los organofosforados y carbamatos.

En la actualidad, los pesticidas organofosforados, que podríamos tratar como: "nuestra segunda generación de pesticidas sintéticos", han sido mejor considerados debido a su relativa baja persistencia, por lo que continúan siendo ampliamente utilizados (19).

Las sustancias químicas que se usan como pesticidas cubren una amplia gama de compuestos. La manera más práctica de agruparlos es teniendo en cuenta el efecto que producen sobre las plagas. De esta forma se clasifican en insecticidas, fungicidas, herbicidas y rodenticidas (20). Cada uno de estos cuatro grupos está compuesto por sustancias de naturaleza diferente y más del 90% del total de los pesticidas utilizados en nuestro país son organosintéticos, de los cuales, más del 50% son insecticidas

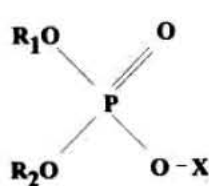
En esta Tesis, nuestro estudio se va a centrar en los pesticidas organofosforados. Éstos son ésteres del ácido fosfórico y sus homólogos: tiofosfórico y ditiofosfórico. Estos compuestos deben su carácter pesticida y

recalcitrante principalmente al enlace fósforo-éster (21). Pueden ser representados por la fórmula general:

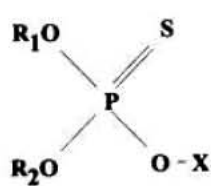


donde **R1** y **R2** son sustituyentes etil o metil; **X** constituye el grupo ácido que generalmente es un residuo de ácido orgánico o inorgánico, como diferentes grupos alquil, alcoxi, aril, tiol, etc. y unido al fósforo por el enlace doble, un átomo del sexto período de la tabla periódica, usualmente oxígeno o azufre.

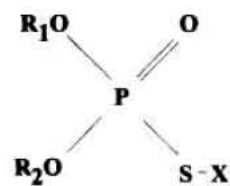
Dependiendo de la posición de los átomos de oxígeno o azufre, se pueden distinguir seis grupos principales de pesticidas organofosforados:



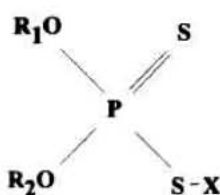
fosfatos



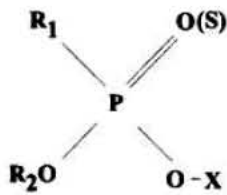
O-tiofosfatos



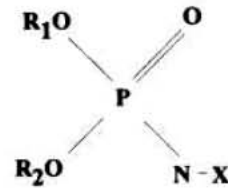
S-tiofosfatos



ditiofosfatos



fosfonatos



fosforamidatos



El grupo sustituyente en X es el más importante, ya que de él dependen las propiedades fisicoquímicas y farmacológicas del compuesto.

Estos ésteres fosforados, como cualquier otro éster, se hidrolizan en mayor o menor proporción, dependiendo de su estructura química. La porción fosfato, tio o ditiofosfato de la molécula le confiere algo de polaridad y por tanto tienen diferentes grados de liposolubilidad (22).

Su volatilidad es muy variable, se pueden presentar como líquidos o sólidos, pero la mayoría de ellos se encuentran en forma de líquidos volátiles. Esta propiedad de volatilizarse es muy importante desde el punto de vista toxicológico, ya que de esta forma la vía de ingreso al organismo es más rápida (vía respiratoria).

En la Tabla I.4 se muestran algunos parámetros característicos de los pesticidas con los que se ha trabajado en el presente estudio.

**Tabla I.4.** - Pesticidas organofosforados estudiados y algunos de los parámetros característicos de los mismos.

Pesticida	Código	Peso Molecular	Solubilidad en agua (g/L)	Punto de ebullición (°C)
Dimetoato	1	229,8	25	117
Metidación	2	302,3	0,25	n/a
Paratión metil	3	263,21	0,055	119
Malatión	4	330,36	0,145	156-157
Etoprofos	5	242,3	0,75	86-91
Paratión etil	6	291,27	0,011	150
Diazinón	7	304,35	0,04	125
Clorpirifos	8	350,6	0,002	n/a

Estos pesticidas organofosforados presentan alta toxicidad dado que son inhibidores permanentes y muy potentes de la enzima colinesterasa, que es la encargada de la degradación de la acetilcolina (transmisor nervioso) en la hendidura sináptica. Dicha enzima al fosforilarse impide la degradación de la acetilcolina, presentándose acumulación de esta sustancia y como consecuencia el cuadro colinérgico típico de la intoxicación (23).

En la Tabla 1.5 se muestra la información toxicológica de los pesticidas utilizados en la presente Tesis Doctoral.

Tabla 1.5.- Toxicidad<sup>a</sup> de los distintos pesticidas organofosforados en estudio expresada en LD50<sup>b</sup>.

Pesticida	LD50 (mg/kg peso corporal)
Dimetoato	291-325
Metidación	25
Paratión metil	6
Malatión	2800
Etoprofos	62
Paratión etil	2-10
Diazinón	300-400
Clorpirifos	135-163

a) Fichas de Seguridad de los estándares adquiridos (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Alemania).

b) LD50: Dosis letales para una mortandad del 50% de una población de ratas.

Los pesticidas organofosforados son eficaces contra una gran variedad de insectos y se utilizan en cosechas agrícolas, edificios residenciales y comerciales, jardines y plantas ornamentales, y para controlar la presencia de mosquitos portadores de enfermedades.

El contacto con pesticidas y su entrada al organismo -a través de la piel, la respiración y/o por ingestión- se produce por exposición laboral y en el hogar debido a usos y aplicaciones incorrectos, con falta de medidas preventivas y de protección.

Aunque los pesticidas han sido diseñados para ofrecer una alta especificidad de acción, su uso genera innumerables efectos indeseados como la generación de organismos resistentes, la persistencia ambiental de residuos tóxicos y la contaminación de recursos hídricos con degradación de la flora y fauna.

La contaminación de los cursos de agua se produce en forma directa por la aplicación de pesticidas en las aguas (arrozales), por lavado de envases o equipos y por descarga de remanentes y residuos. Es igualmente importante la contribución indirecta producida por lixiviación (infiltración) de productos, caída por desniveles y por contaminación de suelos. Las aguas contaminadas expanden el tóxico a la flora y fauna produciendo la muerte de especies, así como la pérdida del curso de agua como recurso utilizable y la probable contaminación de las reservas hídricas (acuíferos).

La aplicación sistemática de plaguicidas altera los equilibrios existentes en las cadenas tróficas normales al causar la desaparición o disminución de los enemigos naturales de distintas plagas, de descomponedores de materia orgánica, de incorporadores de nitrógeno y de otras especies vitales para el ambiente (24, 25). Además de destruir recursos genéticos y farmacológicos conocidos y otros aún no desvelados, el empobrecimiento de la biodiversidad puede conducir a la proliferación de las especies antagónicas de aquellas extinguidas, provocando nuevos desequilibrios ecológicos y nuevas plagas. Un efecto adverso adicional proviene de los envases y contenedores vacíos. En nuestro país no existen normativas para su eliminación y frecuentemente se realiza la incineración a cielo abierto sin tener en cuenta que algunos productos

al ser expuestos al calor desprenden dioxinas cuya toxicidad es ampliamente mayor que el agrotóxico original.

La situación actual, se caracteriza por la restricción en la investigación para el desarrollo de nuevos pesticidas sintéticos y una búsqueda o tendencia a sustituir dichos pesticidas por nuevas alternativas "más ecológicas". Bien sea a través de un control biológico: introducción de predadores naturales, competidores o patógenos de plagas, o bien a través de un control genético: creación de plantas resistentes, liberación de machos estériles, o el uso de feromonas para atraer los insectos a trampas.

A pesar de ello, la realidad es que el uso de pesticidas continúa siendo nuestra mayor arma para el control de plagas. Durante los tres últimos decenios, la lucha contra las plagas y malas hierbas por medios químicos, destinada a reducir las pérdidas, se ha implantado en todo el mundo.

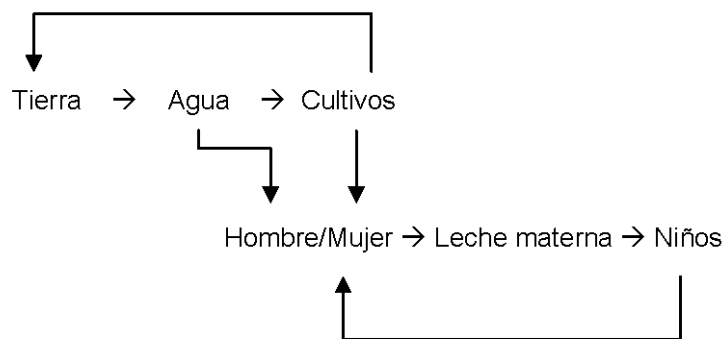
Respecto a la región Canaria, por sus especiales condiciones agrometeorológicas y por la necesidad acuciante de su demografía, ya que sobre las islas se asienta una población de casi dos millones de habitantes, los canarios se han visto obligados a cultivar de una manera preferente productos agrícolas de exportación que llegaran a los mercados consumidores en condiciones óptimas para una fácil y remuneradora colocación.

De ahí la necesidad de utilizar pesticidas que controlen las plagas y posibles enfermedades de los cultivos. En ese sentido, existe una amplia gama de pesticidas y plaguicidas organofosforados que se utilizan en Canarias para combatir plagas, como la de la langosta, o insectos tan extendidos como la mosca blanca, la palomilla o la araña roja. Entre ellos, el dimetoato, malatión y clorpirifos son los más comúnmente utilizados.

Sin embargo, sí hay que destacar que en estas islas, al igual que en muchas otras regiones con actividad agricultora, se utilizaron durante muchos

años pesticidas organoclorados como el DDT, y que su alta persistencia hace que aún hoy se sigan encontrando en el ambiente. Pero es que además, en este tipo de islas de origen volcánico, y debido a la gran permeabilidad de los suelos, esos compuestos pasan con gran facilidad a los acuíferos, o aguas subterráneas que posteriormente son utilizadas bien para consumo o para el regadío de nuevos cultivos.

Por lo que la exposición a esos compuestos sigue, por así decirlo, una cadena cerrada que hace que la presencia de estos compuestos se prolongue aún más en el tiempo.



Teniendo en cuenta lo anterior, se hace necesario, además de una legislación que regule el uso de este tipo de sustancias, una mayor coordinación entre los gabinetes de expertos en medioambiente con las administraciones competentes, y laboratorios de rutina en los que se cuide y vigile el cumplimiento de dichas normas. Por ello, se hace imprescindible el desarrollo de técnicas de análisis que a la vez de ofrecer buenos resultados en el menor tiempo posible sean lo menos perjudiciales al ambiente.

### 1.3 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 dioxinas y pesticidas en una bastísima cantidad y variedad de muestras. A menudo, dichas técnicas no persiguen sólo evitar la manipulación excesiva de las muestras con procedimientos cada vez más rápidos y sencillos, si no 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. Por ello, la utilización de técnicas de separación cromatográficas y posterior análisis es imprescindible. De esta manera, para el análisis de pesticidas y dioxinas se han empleado fundamentalmente:

- Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) acoplada a sistemas de detección Fotodiodo array-Ultravioleta (PDA-UV), Visible-Ultravioleta (vis-UV), Espectrómetro de Masas (MS), y fluorescente (para la determinación de carbamatos previa derivatización) etc,
- Cromatografía de Gases (GC) acoplada a detectores de captura de electrones, detectores de Nitrógeno Fósforo (NPD), Espectrómetro de Masas (MS), Doble Espectrómetro de Masas (MS/MS), Espectrómetro de Masas de Alta Resolución (HRMS),
- Y, electroforesis capilar (CE).

Como complemento a estas técnicas y paso previo a las mismas 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 de tipo líquido-líquido (LLE) (26), extracción en fase sólida (SPE) (27), microextracción en fase sólida

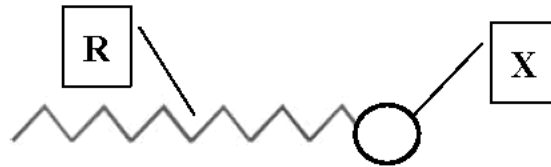
(SPME) (28), etc. Mientras que para la extracción en matrices sólidas se hace uso de metodologías como Soxhlet (29), agitación (shake-flask) (30), sonicación (31) o extracción asistida por microondas (32).

En las distintas técnicas de extracción anteriormente mencionadas, tanto para la extracción de compuestos en muestras líquidas como en sólidas, 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 (que los inhalan) 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 totalmente la utilización de disolventes orgánicos, en el análisis de dioxinas y pesticidas organofosforados 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, en la presencia en una misma molécula de dos o más grupos con propiedades antagónicas respecto a su solubilidad en un determinado disolvente (33). 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* (Figura 1.4).

**Figura I.4.-** Esquema de la estructura molecular de un monómero de surfactante.



Dependiendo de la naturaleza de esa cabeza hidrofílica, los surfactantes se clasifican en cuatro grupos diferentes (34):

- **Catiónicos:** en los que el grupo hidrofílico tiene carga positiva. (Ej.: sales de amonio cuaternarias).

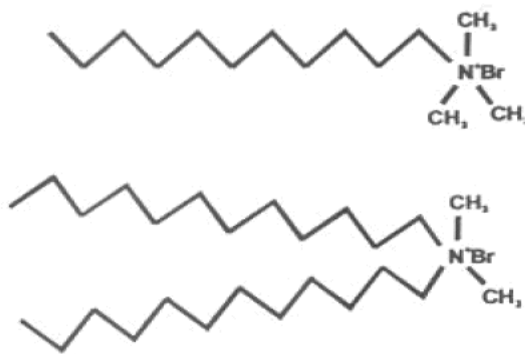


Figura I.5.- Ejemplo de sales de amonio cuaternarias

- **Aniónicos:** en los que el grupo hidrofílico tiene carga negativa. (Ej.: sales de ácidos alquil carboxílicos o sulfónicos).



Figura I.6.- Alquil sulfato



Figura I.7.- Alquil carboxilato (jabón)



- **Zwitteriónicos o Anfóteros:** en los que el grupo hidrofílico tiene cargas positiva y negativa. (Ej.: aminoácidos).

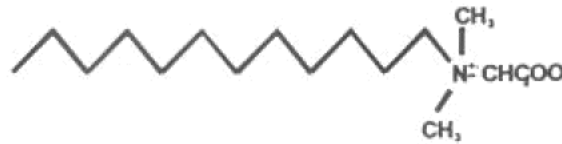


Figura I.8.- Alquil betaina

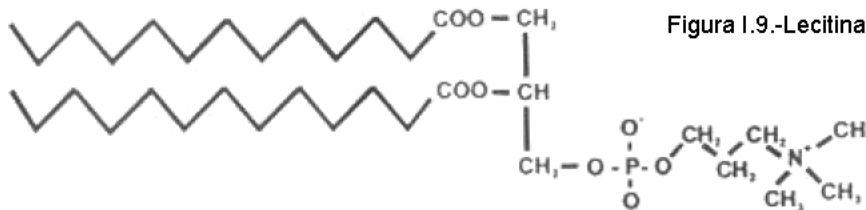


Figura I.9.-Lecitina

- **No iónicos:** en los que el grupo hidrofílico no posee carga. (Ej.: los monoglicéridos y alquilglucósidos).



Figura I.10.- Alcohol graso etoxilado



Figura I.11.- Alquilglucósido

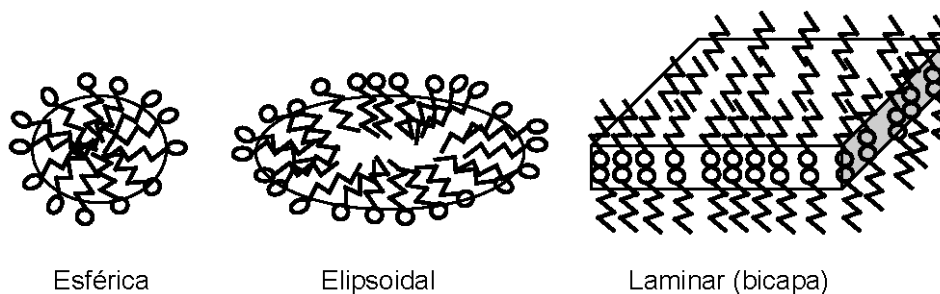
### Concentración micelar crítica

Debido al carácter anfipático de los surfactantes, sus moléculas en presencia de agua u otro disolvente con propiedades fuertemente polares o apolares, se adsorben en las interfases, disminuyendo las tensiones interfaciales

y se autoagregan espontáneamente formando estructuras organizadas llamadas "micelas".

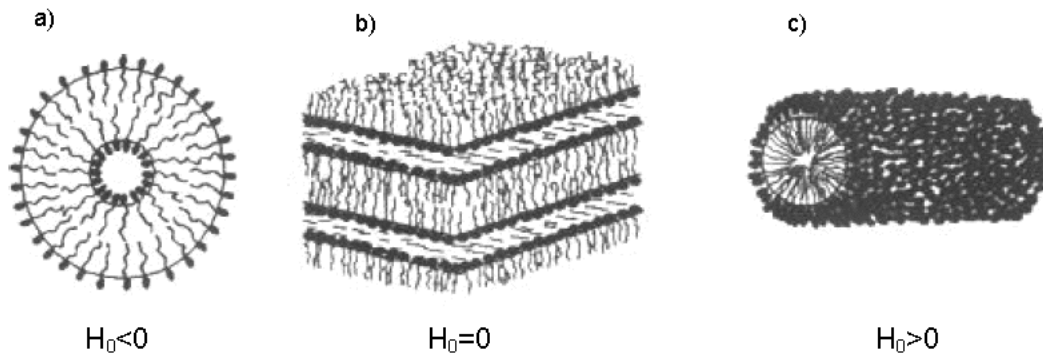
Las micelas se forman cuando la concentración de surfactante alcanza un valor determinado, conocido como *concentración micelar crítica (c.m.c.)*, a partir del cual la autoagregación es espontánea. A concentraciones cercanas a la c.m.c. las micelas son esféricas (3-6 nm de diámetro) y con 30-200 monómeros (34). Sin embargo, a concentraciones mayores, se produce un aumento de las interacciones intermicelares, lo cual provoca un cambio en la estructura de las micelas hacia formas más alargadas (laminar, cilíndrica, tubular, espiral, etc.), con diferentes grados de curvatura y dimensiones características (35). Estas nuevas formas micelares se pueden considerar como precursoras de las entidades estructurales (36).

Figura I.12.- Estructura de una micela y otras configuraciones más alargadas.



La autoagregación se origina al minimizarse la energía libre de interacción intermolecular y da lugar a una gran variedad de estructuras supramoleculares con interfases de tipo líquido-líquido (micelas directas, micelas reversas, micro-emulsiones, estructuras monocapa, bicapa, vesículas, etc.). A continuación se muestran algunas de las configuraciones que pueden adoptar dichos agregados micelares (Figura I.13):

**Figura I.13.-** Ejemplos de estructuras que pueden adoptar los agregados micelares y el grado de curvatura espontánea de las moléculas de surfactante en la interfase.



a) Vesícula, b) Cristal líquido, c) Micela cilíndrica directa.

$H_0$ : curvatura espontánea de las moléculas de tensioactivo en la interfase.

En las disoluciones micelares, las micelas individuales están dotadas de libertad de orientación y movimiento en el disolvente, constituyendo un sistema dinámico en el que los monómeros de surfactante están en equilibrio con las micelas y el resto de la disolución.

Cabe destacar que las moléculas de surfactante no se asocian por enlaces covalentes sino por interacciones más débiles (Van der Waals, puentes de hidrógeno, electrostáticas, etc.). 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, la presión, etc. (37).

### Aplicaciones de los medios micelares

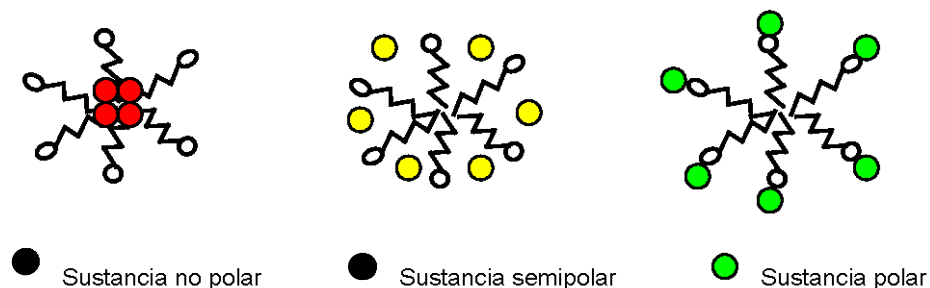
Una de las propiedades más importantes de los surfactantes, relacionada con su capacidad para formar micelas es la solubilización de solutos, lo que

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 (34).

Entre los sistemas organizados anteriormente nombrados, las micelas, formadas tanto en disolución acuosa (micelas directas) como en medio no acuoso (micelas reversas) han merecido especial atención por ser la estructura básica de las microemulsiones, por su capacidad de solubilización, y como nuevos medios de reacción en numerosas reacciones orgánicas e inorgánicas (38).

Una de las propiedades más importantes de las micelas, al presentar una microestructura con dominios hidrófilos y lipófilos diferenciados, es, como ya se ha mencionado, su capacidad para solubilizar moléculas tanto polares como no polares. En el siguiente esquema se muestra la localización del solubilizado en un agregado micelar en función de su naturaleza polar, semipolar o apolar.

Figura I.14.- Esquema de localización de los analitos en el agregado micelar según su naturaleza polar.



Como se aprecia en el esquema anterior, la solubilización se localiza en diferentes puntos en función de la naturaleza de la especie solubilizada pero también del surfactante. Así por ejemplo, en el caso de los surfactantes no

iónicos, la solubilización se produce generalmente entre las cabezas hidrofílicas (34).

Las interacciones entre el soluto y el surfactante pueden ser electrostáticas, hidrofóbicas o más normalmente, una combinación de ambos efectos (39). Por otro lado, hay que considerar que la solubilización es un proceso dinámico en el que la sustancia solubilizada está en equilibrio entre la micela y la fase acuosa. También es importante la naturaleza del analito, en el sentido de que, cuanto mayor sea su hidrofobicidad mayor será su permanencia en la micela.

Esta capacidad de solubilización hace que los agregados micelares posean importantes aplicaciones en campos como el químico, farmacéutico, fitosanitario, cosmético, etc. (40), 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.

También, debido a las características de su elevada superficie interfacial, el poseer micro y nanoestructuras, y su capacidad de solubilización, resultan idóneos como medios de reacción. Se ha demostrado que pueden aumentar sensiblemente la velocidad de reacción para determinadas reacciones químicas al realizarse en dichos medios (41-43). Lo que abre perspectivas, económicamente muy interesantes, para muchos procesos de síntesis química, enzimática, biológica, etc.

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-, así como con la técnica de Electroforesis capilar (44).

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.

### Surfactantes no iónicos

En la presente Tesis Doctoral, hemos centrado nuestro estudio en algunos surfactantes no-iónicos como medio de solubilización (extracción) de los compuestos de interés debido a las propiedades tan interesantes que poseen, y que desarrollaremos en los siguientes capítulos.

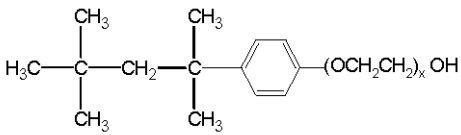
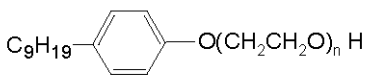
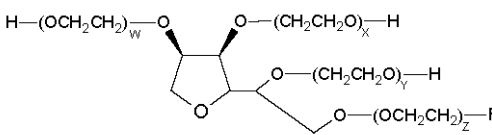
A diferencia de los surfactantes iónicos, los surfactantes no iónicos suelen tener concentraciones micelares críticas menores y números de agregación más altos, debido en parte a la ausencia de repulsiones electrostáticas entre las cabezas de los surfactantes no iónicos.

En este tipo de surfactantes, la parte hidrofílica de la molécula de tensioactivo viene dada por grupos polioxietilénicos, mientras que la parte hidrofóbica puede estar constituida por una variedad de grupos apolares como cadenas alquílicas, alquilbencenos, cadenas de polioxipropileno, etc (45). En la siguiente tabla se muestra la estructura de algunos de los surfactantes no iónicos más importantes.

Los surfactantes no iónicos del tipo polioxietilen alquil éteres tienen la fórmula general  $C_nH_{2n+1}(OCH_2CH_2)_mOH$ , aunque 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.

Tabla I.6.- Surfactantes no iónicos<sup>a</sup>.

Tipo	Estructura	Fórmula
<u>Polioxietilen alquil éteres</u>		
C <sub>12</sub> E <sub>4</sub> (Brij 30)		C <sub>i</sub> E <sub>j</sub>
C <sub>12</sub> E <sub>9</sub> (Polidocanol)	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>i-1</sub> -O-(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O) <sub>j</sub> -H	
C <sub>12</sub> E <sub>10</sub> (POLE)		
C <sub>25</sub> E <sub>10</sub> (Brij 56)		
Polioxietilen metil-n-alquil éteres	CH <sub>3</sub> -(OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>m</sub> -O-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> -H	C <sub>i</sub> E <sub>m</sub> C <sub>n</sub>
<u>Octilfenoxi polioxietilen éteres</u>		
OPE5 (Triton X-45)		OPE <sub>x</sub>
OPE7-8 (Triton X-114)		
OPE9-10 (Triton X-100)		
<u>Polioxietilen nonilfenil éteres</u>		
NPE7.5 (PONPE-7.5)		NPE <sub>n</sub>
NPE8-9 (Igepal CO-610)		
NPE9-10 (Triton N-101)		
<u>Polioxietilen sorbitan éteres de ácidos grasos</u>		
Tween 20 (Sorbitol Monolaurato)		
Tween 40 (Sorbitol Monopalmitato)		
Tween 80 (Sorbitol Monooleato)		

<sup>a</sup> Hinze, W.L., 1993 (46).

Este tipo de surfactantes fue sintetizado por primera vez a principios de los años 30 (47). Desde entonces, su detergencia, sus propiedades humectantes y esponjantes los han hecho ampliamente utilizados en industrias y productos domésticos.

Desde el punto de vista analítico, también presentan una serie de características altamente interesantes, entre las que destacan:

- La capacidad de modificar equilibrios ácido-base y redox, lo que permitiría utilizarlos como componentes de electrodos aptos para ciertas aplicaciones electroquímicas, electrocatálisis...etc. (48). Así por ejemplo, se han empleado para la preconcentración de ciertos elementos sobre electrodos de carbono (49)
- La capacidad de actuar como medios de reacción en los que se modifican las propiedades luminiscentes de algunos compuestos, lo que permite en muchos casos mejorar la detección de los mismos. Así por ejemplo se han empleado para mejorar la detección espectrofotométrica y fluorimétrica de muchos iones metálicos (50)
- La capacidad solubilizadora, por lo que se emplean como extractantes de compuestos tanto orgánicos como inorgánicos y de muestras tanto líquidas como sólidas. Así por ejemplo se han utilizado para extraer sustancias activas (derivados del Ginsen) de plantas medicinales (51), metales pesados como el Cu (II) de muestras acuosas (52), disruptores endocrinos de sedimentos y cangrejos de río (53)...etc.



#### 1.4 OBJETIVOS DEL TRABAJO

El objetivo de todo nuevo proceso analítico se basa siempre en la búsqueda de nuevos procedimientos que permitan optimizar la sensibilidad, selectividad, rapidez, coste y eviten la contaminación-peligrosidad de los ya existentes.

En la presente Tesis Doctoral se plantea, como objetivo general:

- La optimización y desarrollo de nuevos métodos de extracción y preconcentración de dos familias de compuestos contaminantes, dioxinas policloradas y pesticidas organofosforados, presentes en muestras medioambientales de diferente naturaleza, empleando para ello los medios micelares como extractantes.

Las familias de contaminantes a estudiar comprenden mezclas de distintos compuestos escogidos en función de su mayor potencial tóxico (en el caso de las dioxinas) o de su mayor aplicación en los tratamientos agrícolas actuales (en el caso de los pesticidas). Y como extractantes, los surfactantes no iónicos Polioxietilén 10 Lauril Éter (POLE) y Oligoetilén Glicol Monoalquil Éter (Genapol X-80), que presentan una fácil manipulación y bajo coste.

Entre otras ventajas, respecto de los métodos convencionales empleados para el análisis de estas sustancias, se pretende conseguir una reducción considerable del tiempo empleado en el tratamiento, extracción y análisis de las muestras, usando metodologías mucho más simples y rápidas, y la sustitución de los extractantes que se emplean, generalmente disolventes orgánicos, por medios micelares que son menos perjudiciales al medio ambiente debido a su biodegradabilidad.

De esta forma, se plantean a su vez una serie de objetivos específicos:

- Establecer las condiciones más adecuadas para la separación cromatográfica de las dos familias de compuestos a estudiar, empleando como técnica la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa.
- Caracterización de los surfactantes utilizados en el estudio en presencia de sal (NaCl), lo que implica la determinación de la Temperatura de Punto de Nube y Relación de Fases en estas nuevas condiciones.
- Establecer las condiciones más adecuadas para la óptima extracción y preconcentración de los distintos compuestos en muestras líquidas usando la metodología de Punto de Nube, lo que implica la determinación de la concentración de surfactante, concentración de sal y tiempo de extracción más adecuados.
- Determinar los parámetros analíticos de la metodología optimizada. Lo que incluye el estudio de Reproducibilidad y Límites de Detección. Así como la validación del método propuesto comparándolo con otras técnicas de extracción (Extracción Líquido-Líquido en el caso de las dioxinas) o mediante su aplicación a la extracción y análisis de una mezcla certificada (en el caso de los pesticidas organofosforados).
- Aplicar la metodología de extracción y preconcentración por Punto de Nube a muestras acuosas de diferente procedencia y tratamiento, así como diferente contenido salino para evaluar la versatilidad del método.
- Establecer las condiciones más adecuadas para la óptima extracción de los distintos compuestos en muestras sólidas minerales bajo la metodología de Extracción Micelar Asistida por Microondas, lo que implica la determinación de la concentración de surfactante, concentración de sal, tiempo y potencia de radiación microondas más

adecuadas así como la determinación de la influencia del pH en el caso de los pesticidas organofosforados.

- Determinar los parámetros analíticos de la metodología propuesta, lo que implica el estudio de Reproducibilidad y Límites de Detección. Así como la validación del método propuesto comparando los resultados obtenidos con el mismo, con los encontrados por otras técnicas de extracción (Soxhlet) o mediante su aplicación a la extracción y análisis de una mezcla certificada.
- Aplicar la metodología de Extracción Micelar Asistida por Microondas a muestras sólidas de diferente procedencia y diferentes parámetros físico-químicos (pH, contenido en materia orgánica y granulometría) para evaluar la versatilidad del método.
- Aplicar el método propuesto a muestras de suelo enriquecidas con pesticidas, después de diferentes periodos de envejecimiento, con objeto de evaluar su aplicabilidad a muestras reales en las que se desconoce el tiempo de contacto de los analitos en la muestra.
- Establecer las condiciones más adecuadas para la óptima extracción de los pesticidas organofosforados en muestras de vegetales usando la metodología de Extracción Micelar Asistida por Microondas. Ello implica la determinación de la concentración de surfactante, concentración de sal, tiempo y potencia de radiación microondas más idóneas, así como la determinación de la influencia del pH en el proceso.
- Determinar los parámetros analíticos característicos del método propuesto, lo que implica el estudio de Reproducibilidad y Límites de Detección. Así como la validación del mismo, comparándolo con otras técnicas de extracción (Ultrasonidos) y su aplicación del método propuesto a la extracción y análisis de una mezcla certificada.

- Aplicar la metodología de Extracción Micelar Asistida por Microondas a diferentes muestras vegetales para evaluar la versatilidad y potencialidad del método.

### 1.5 BIBLIOGRAFÍA

- 1) Wu, W.Z.; Schramm, K.W.; Kettrup, A. *Water Res.* 35 (2001) 1141.
- 2) IARC (1997) Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans Polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans. Vol.69. International Agency of Research on Cancer. Lyon, France.
- 3) Pöpke, O. *Environ. Health Perspect.* 106 (1998) 723.
- 4) Govers, H.A.J.; Krop, H.B. *Chemosphere* 37 (1998)2139.
- 5) Wang, Y.H.; Wong, P.K. *Water Res.* 36 (2002) 350.
- 6) NATO/CCMS (1988). *International Toxicity Equivalency Factor (I-TEF) Method of Risk Assessment for Complex Mixtures of Dioxins and Related Compounds*. Report Number 176, North Atlantic Treaty Organization, Committee on Challenges of Modern Society.
- 7) Sakurai, T.; Kim, J.G.; Suzuki, N.; Nakanishi, J. *Chemosphere* 33 (1996) 2007.
- 8) Eljarrat, E.; Caixach, J.; Rivera, J. *Water Res.* 35 (2001) 2799.
- 9) Fletcher, C.L.; Mc Kay, W.A. *Chemosphere* 26 (1993) 1041.
- 10) WHO/IPCS (1989) Polychlorinated Dibenzo-p-Dioxins and Dibenzofurans. Environmental Health Criteria 88. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- 11) Domingo, J.L.; Schuhmacher, M.; Granero, S.; Llobet, J.M. *Chemosphere* 38 (1999) 3517.

- 12) Lassek, E.; Jahr, D.; Mayer, R. *Chemosphere* 27 (1993) 519.
- 13) Kim, Y.; Yang, S.H.; Lee, S.Y.; Kim, M. *Chemosphere* 43 (2001) 851.
- 14) Focant, J.F.; Pirard, C.; De Pauw, E. *Chemosphere* 54 (2004) 137.
- 15) <http://europa.eu.int/comm/environment/dioxin/summary.pdf>
- 16) Council Regulation (EC) No 2375/2001 of 29 November 2001 amending Commission Regulation (EC) No 466/2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs.
- 17) FAO (1986a) Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de plaguicidas. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia.
- 18) Codex (1984) Guide to Codex recommendations concerning pesticide residues. Part 1. General notes and guidelines. (Report CAC/PRI-1984). The Hague.
- 19) Anson Moye, H. (Ed.). (1981) *Analysis of Pesticide Residues*, vol 58. John Wiley & Sons, New York/Chichester/Brisbane/Toronto. USA.
- 20) Madrigal, A. *Contaminación ambiental* 2 (1978) 27.
- 21) Kotronarou, A.; Mills, G.; Hoffmann, R. *Environ. Sci. Technol.* 26 (1992) 1460.
- 22) Lacorte, S.; Ehresmann, N.; Barcelo, D. *Environ. Sci. Technol.* 29 (1995) 2834.
- 23) Kumar, S. *Pestic. Biochem. Physiol.* 78 (2004) 140.

- 24) Crathorne, B.; Dobbs, A.F. (1990) *Pollution. Causes, Effects and Control.* (Ed. R.M. Harrison) Royal Society of Chemistry. Cambridge, UK.
- 25) Millar, G.T. (1994) *Ecología y Medio Ambiente.* Grupo Edit. Iberoamérica. México D.F., México.
- 26) US Environmental Protection Agency, Method 1613, Washington, DC, 1994.
- 27) Ballesteros, E.; Parrado, M.J. *J. Chromatogr. A* 1029 (2004) 267.
- 28) Fernández, M.; Padrón, C.; Marconi, L.; Ghini, S.; Colombo, R.; Sabatini, A.G.; Girotti, S. *J. Chromatogr. A* 922 (2001) 257.
- 29) Senthil Kumar, K.; Kannan, K.; Corsolini, S.; Evans, T.; Giesy, J.P.; Nakanishi, J.; Masunaga, S. *Environ. Pollut.* 119 (2002) 151.
- 30) Mol, H.G.J.; van Dam, R.C. J.; Steijger, O.M. *J. Chromatogr. A* 1015 (2003) 119.
- 31) Gonçalves, C.; Alpendurada, M.F. *Talanta* 65 (2005) 1179.
- 32) López-Ávila, V.; Young, R.; Benedicto, J.; Ho, P.; Kim, R.; Beckert, W.F. *Anal. Chem.* 67 (1995) 2096.
- 33) Rosen, M.J. (1986) *Surfactants and Interfacial phenomena,* John Wiley & sons. USA.
- 34) Pelizzetti, E.; Pramauro, E. *Anal. Chim. Acta* 169 (1985) 1.
- 35) Hoffman, H. *Adv. Matter* 6 (1994) 116.
- 36) Solans, C.; Esquena, J.; Azemar, N.; García Celma, M.J. *Química e Industria* (2001) 15-22.

- 37) Israelachvil, J. (1992) Intermolecular and Surface Forces. Academic Press, UK.
- 38) Ródenas, E.; Ortega, F.; Vera, S.; Otero, C.; Maestro S. (1990) Surfactants in Solutions. Ed. Mittal, K.L. Vol.9. Plenum Press, New York.
- 39) Nagarajan, R.; Ruckenstein, E. Separation Science and Technology 16 (1981) 1429.
- 40) Uhrich, K.E. Chem. 99 (1999) 3181.
- 41) Pillai, V.; Shah, D.O. (1997) Industrial applications of Microemulsions. Eds: Solans, C.; Kunieda, H. Surfactant Series, vol. 66. Marcel Dekker, New York, USA.
- 42) Pinazo, A.; Infante, M.R.; Izquierdo, P.; Solans, C.J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2 (2000) 1535.
- 43) Solans, C.; Pinazo, A.; Calderó, G.; Infante, M.R. Colloid. Surf. 176 (2001) 101.
- 44) Watari, H. J. Chromatogr. A 780 (1997) 93.
- 45) Cross, J. (1987) Nonionic Surfactants, Chemical Analysis, Surfactant Science Series, vol. 19. Marcel Dekker, New York, USA.
- 46) Hinze, W.L.; Pramauro, E. Crit. Rev. Anal. Chem. 24 (1993) 133.
- 47) Shöller, C.; Wittwer, M. German Patents P. 605.973, P. 667.744, P. 694.178 to BASF, 30 November 1930.
- 48) Peng, Z.; Qu, X.; Dong, S. J. Electroanal. Chem. 563 (2004) 291.
- 49) Svancara, I.; Foret, P.; Vytras, K. Talanta 64 (2004) 844.



- 50) Lin, J.M.; Yamada, M. *TrAC, Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 99.
- 51) Choi, M.P.K.; Chan, K.K.C.; Leung, H.W.; Huie, C.W. *J. Chromatogr. A* 983 (2003) 153.
- 52) Kulichenko, S.A.; Doroschuk, V.O.; Lelyushok, S.O. *Talanta* 59 (2003) 767.
- 53) Patrolecco, L.; Capri, S.; De Angelis, S.; Polesello, S.; Valsecchi, S. *J. Chromatogr. A* 1022 (2004) 1.



## **CAPÍTULO II.- MATRICES LÍQUIDAS**



## II.1 INTRODUCCIÓN

### *II.1.1 Técnicas de extracción en matrices líquidas*

La metodología tradicional empleada para la extracción de diferentes compuestos en muestras acuosas, ha sido la extracción líquido-líquido (LLE). Esta técnica es la que se emplea por ejemplo, como método multiresiduo convencional para la determinación de pesticidas organoclorados y organofosforados en leche que es donde tienden a acumularse (1). Con dicha metodología, los pesticidas son extraídos junto con el contenido graso total de la leche.

La técnica de extracción líquido-líquido implica normalmente la utilización de grandes cantidades de disolventes orgánicos lo que conlleva un alto coste, toxicidad y gran volumen de residuos, así como tiempos de extracción largos. Además, presenta otras desventajas como no ser adecuada para matrices oleaginosas, requiriendo un tratamiento adicional de la muestra, posibilidad de incompatibilidad del disolvente a utilizar con la fase móvil del cromatógrafo, y obtención de unas recuperaciones bajas, que varían en función del compuesto a determinar. Por todo ello se tiende a reemplazar dicho procedimiento de extracción, por otros que consigan evitar la excesiva manipulación de la muestra, las posibles pérdidas de los analitos por volatilización, y la utilización de disolventes tóxicos (2).

Una de las técnicas propuestas para la sustitución de la extracción líquido-líquido y que ha tenido una gran aceptación, es la extracción en fase sólida (SPE), ya que permite, una extracción más selectiva y una preconcentración de los analitos (3-7). Sin embargo, esta técnica presenta a su vez una serie de desventajas para el análisis de muestras acuosas, entre ellas: la limitación de la cantidad de muestra que puede pasar a través del relleno de dicha fase sólida ("breakthrough volume"), la necesidad de escoger el relleno más adecuado al tipo de analito que se desea extraer, la posible co-extracción de analitos no deseados presentes en la matriz y que a su vez limita la capacidad de retención de los compuestos a extraer, lentitud en el procesado de las muestras, y por último, coincidiendo con la extracción LLE, requiere la utilización de disolventes orgánicos y un tiempo considerable para todas las operaciones manuales implicadas (8).

Otra técnica más moderna que se ha desarrollado es la microextracción en fase sólida (SPME) (9, 10). Esta técnica permite el análisis usando una cantidad mínima de muestra, alcanzando preconcentraciones muy altas, al concentrar todos los analitos en la superficie de una microfibra -con lo que se mejora notablemente la sensibilidad-. Además permite que la muestra sea introducida directamente en el cromatógrafo (bien en cromatografía líquida como gaseosa), por lo que no se requieren mayores tratamientos ni manipulaciones del extracto. Pero presenta dos grandes inconvenientes: la respuesta de la fibra varía en el tiempo (en detrimento de la reproducibilidad de los métodos que hacen uso de esta técnica), y el tiempo de adsorción de los compuestos en la fibra es, en la mayoría de los casos, muy largo (45-120 min).

También se han desarrollado otras técnicas como la microextracción líquido-líquido (LLME) (11) basada en la técnica de extracción clásica pero que permite la utilización de una cantidad mínima de muestra, y la microextracción en fase líquida (LPME), basada en la utilización de fibras huecas desechables. En este caso la extracción de los compuestos de muestras acuosas se produce

a través de una fina capa de disolvente orgánico inmovilizado dentro de los poros de la pared de la fibra hueca porosa, dentro de la cual hay un volumen mínimo ( $\mu\text{L}$ ) de disolución aceptora dentro del lumen de la fibra; después de la extracción, la disolución aceptora se introduce directamente en cromatógrafos o espectrómetros de masas sin mayor tratamiento (12).

A continuación se muestra una tabla con algunos ejemplos de aplicación de estas técnicas en la extracción de dioxinas y pesticidas organofosforados.

**Tabla II.1.-** Técnicas empleadas en la extracción de dioxinas y pesticidas organofosforados en muestras acuosas.

Compuesto	Matriz	Técnica	Extractante	Complejidad	Referencia
Dioxinas	Agua (<1% sólidos)	LLE	Cloruro de metileno	alta	13
Dioxinas	Agua de mar, lluvia, agua depurada	SPE	Etanol-tolueno	alta	14
Dioxinas	Agua de mar	SPE	acetona	alta	15
Dioxinas	Agua	SPE	Hexano	alta	16
Pesticidas OP*	Agua potable	SPE	Acetato de etilo	Media	17
Pesticidas OP*	Agua subterránea	LLME	Metil terbutil éter	media	18
Pesticidas OP*	Agua potable	SPE	Acetonitrilo-agua	media	19

\*Pesticidas organofosforados.

Sin embargo, en todas ellas se siguen utilizando disolventes orgánicos como extractantes, presentan una gran complejidad en el manejo de la muestra

(pretratamiento y posterior extracción), y un alto coste instrumental. Una alternativa a ellas sería la utilización de los llamados medios micelares como extractantes.

### *II.1.2 Surfactantes como alternativa (CPE)*

Una de las propiedades más interesantes de los surfactantes es su capacidad para solubilizar compuestos de diferente carácter y naturaleza mediante su asociación con las micelas. Dichas sustancias pueden interactuar con las micelas por efectos electrostáticos, hidrofobicidad o por una combinación de ambos efectos. De manera que, la misma capacidad que permite aumentar su solubilidad en un medio determinado, los hace a su vez ideales como extractantes precisamente por esa asociación-interacción con las micelas.

Por ello, dichos sistemas han sido ampliamente utilizados en la extracción de sustancias orgánicas como compuestos organoclorados, hidrocarburos aromáticos policíclicos, vitaminas, etc., en una variedad de matrices como suero humano o sangre (20, 21), agua de río (22), agua de mar (23), etc., así como compuestos inorgánicos (24), lo que evidencia el alto potencial de estos extractantes biodegradables en el campo analítico medioambiental.

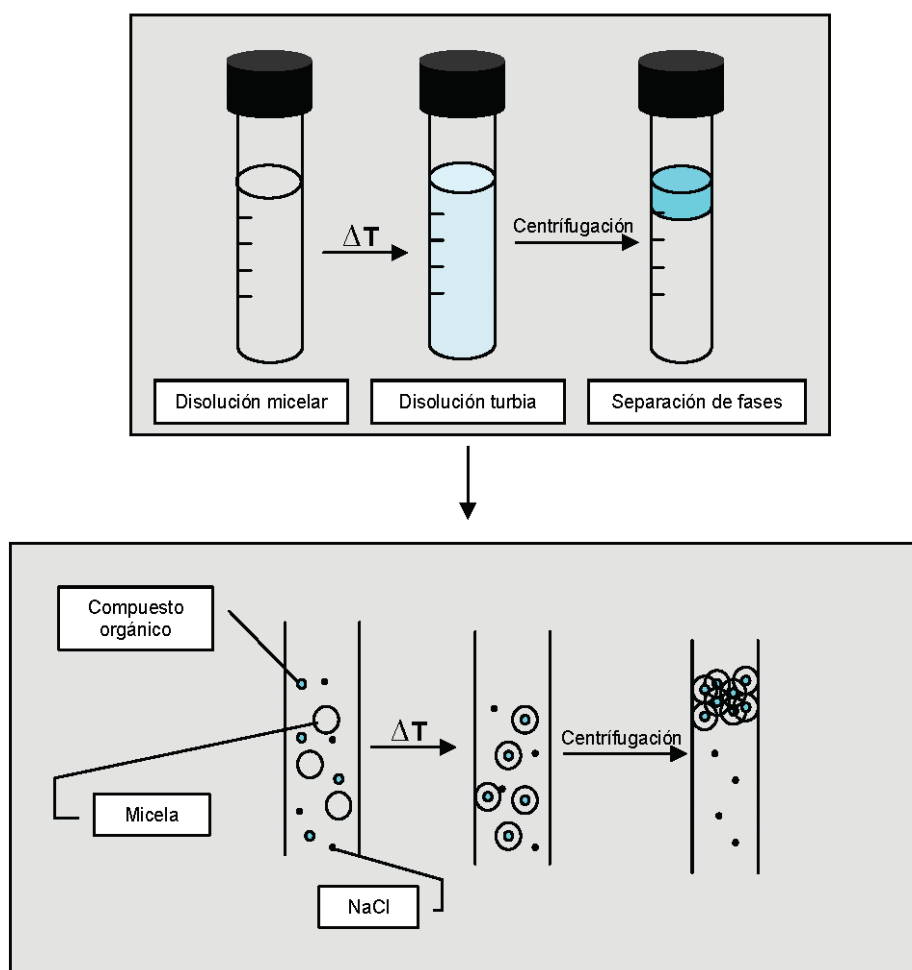
La utilización de los surfactantes como extractantes se debe a la capacidad que presentan las disoluciones acuosas de los surfactantes tanto no iónicos como zwitteriónicos (25), de producir el fenómeno llamado *punto de nube* (o "*cloud point*"), cuando las mismas se calientan a una determinada temperatura (26, 27). Por encima de dicha temperatura, se produce un enturbiamiento de la disolución y posteriormente la separación en dos fases isotrópicas (Figura II.1): una fase rica en surfactante, de menor volumen, que contiene una pequeña cantidad de agua (fase de surfactante), y otra fase acuosa, en la cual la concentración de surfactante es aproximadamente igual a la concentración



micelar crítica del surfactante presente. Así, los analitos presentes en la disolución, y que interaccionan con las micelas, pasarían a la fase rica en surfactante. Es decir, que de esta forma se consiguen la extracción y preconcentración de los analitos en una sola etapa, metodología conocida como *Extracción por Punto de Nube* o *Cloud Point Extraction (CPE)*.

En la Figura II.1 se presenta un esquema de la extracción por punto de nube.

Figura II.1.- Esquema de extracción con surfactantes por la metodología de *punto de nube*.



El mecanismo por el cual tiene lugar la separación de fases es poco conocido. Para los surfactantes no iónicos, algunos autores han propuesto que cuando aumenta la temperatura de la disolución, podría producirse un incremento en el número de agregación de las micelas con el consiguiente incremento en el tamaño de las mismas (28, 29). Otros sugieren que para dichos surfactantes el mecanismo de la separación de fases puede estar basado en un cambio en las interacciones micelares, que serían repulsivas a bajas temperaturas, pero predominantemente atractivas a temperaturas más elevadas (30). Y otros, atribuyen el fenómeno de *Punto de Nube* a los procesos de deshidratación que tienen lugar en la capa externa de las micelas cuando se incrementa la temperatura (31).

En cualquier caso, la solubilización de compuestos orgánicos en las micelas y su subsecuente extracción y preconcentración, ofrece una alternativa muy conveniente a otras metodologías de extracción de muestras acuosas como se ha mostrado en algunos estudios (22, 27, 32, 33).

Las ventajas que presenta esta metodología frente a las metodologías convencionales pueden resumirse en:

- 1) Capacidad para concentrar una gran variedad de analitos de diferente naturaleza, con altas recuperaciones y altos factores de concentración, ya que los analitos pueden ser extraídos en volúmenes muy pequeños de fase rica en surfactante (0.2-0.4 mL).
- 2) Se obtienen altos factores de preconcentración ( $\geq 10$  veces).
- 3) Seguridad en la atmósfera de trabajo y en el medioambiente por su biodegradabilidad.
- 4) Bajo de coste, ya que sólo es necesario un pequeño volumen de surfactante frente a los grandes volúmenes de disolventes orgánicos

utilizados en las metodologías de extracción convencionales.

- 5) El extracto (fase rica en surfactante) es compatible con la fase móvil utilizada en cromatografía líquida tanto micelar como convencional.
- 6) Mejora la sensibilidad en la detección de ciertos analitos cuando están presentes en la fase rica en surfactante respecto a la de los mismos en fase acuosa (34).

Para la optimización de la extracción mediante este procedimiento, hay que controlar: a) la temperatura de *punto de nube* a la cual se da el fenómeno, para asegurar que tiene lugar la separación de fases, b) la relación de fases que se obtiene después de la separación de las mismas, ya que determinará el grado de preconcentración de los analitos, y c) la capacidad para solubilizar (extraer) los analitos ya que es el objetivo del proceso.

- ***Temperatura de punto de nube***

Como ya se comentó anteriormente, la separación de fases en el fenómeno de *punto de nube* tiene lugar en un rango estrecho de temperaturas; sin embargo, dicha temperatura puede variar en función de los siguientes parámetros:

- a) Naturaleza del surfactante

Para una serie homóloga de surfactantes polioxietilénicos (no iónicos) la temperatura de *punto de nube* aumenta a medida que disminuye la longitud de la cadena hidrocarbonada, y al aumentar la longitud de la cadena de oxietileno (35). En la Tabla II.2 puede

observarse que para surfactantes como el  $C_{12}E_6$  y  $C_{12}E_8$ , que poseen el mismo número de átomos de carbono en la cadena alquílica, pero distinto número de unidades oxietilénicas, las temperaturas de *punto de nube* obtenidas para el  $C_{12}E_8$  son superiores. Sin embargo, si comparamos las temperaturas obtenidas para los surfactantes  $C_{10}E_6$  y  $C_{12}E_6$ , se observa que la temperatura aumenta a medida que la cadena alquílica se hace más corta.

Para un contenido constante de oxietileno en la molécula de surfactante, la temperatura de *punto de nube* disminuye también cuando se ramifica el grupo hidrofóbico o si se reemplaza el grupo hidroxilo terminal del grupo hidrofílico por un grupo metilo.

#### b) Adición de sales

La temperatura a la que se produce el fenómeno de separación de fases para un surfactante dado puede ser alterada por la presencia de sales en la disolución. La adición de electrólitos como cloruros, sulfatos, carbonatos, etc., provoca una disminución de la temperatura a la cual se produce el fenómeno de *punto de nube*. Sin embargo, hay electrólitos como nitratos, yoduros, tiocianatos, etc., que producen el efecto contrario, es decir, provocan un aumento de dicha temperatura (36-42).

Ello es debido al efecto que producen las sales en las propiedades físico-químicas de las disoluciones anfífilas en cuanto a que pueden aumentar, "salting-in", o disminuir, "salting-out", su solubilidad. De esta forma que será necesario aplicar más o menos calor al sistema, respectivamente, para que se produzca la separación de las fases.

Tabla II.2.- Temperaturas de *punto de nube* para diferentes surfactantes polioxietilénicos.

Surfactante	Temperatura (°C)	Ref.
C <sub>10</sub> E <sub>6</sub>	59-63	(48)
	58	(49)
	60	(50)
	62.2	(51)
	63	(52)
C <sub>12</sub> E <sub>6</sub>	50	(48)
	50.3	(53)
	51.3	(54)
	52.5	(52)
	53.2	(55)
C <sub>12</sub> E <sub>8</sub>	51.1	(51)
	75.5	(56)
	77	(48)
	78	(52, 55)
	78.4	(51)
	79.2	(57)

### c) Presencia de compuestos orgánicos

La adición de hidrocarburos saturados de cadena corta no da lugar a disminuciones importantes en la temperatura de *punto de nube*; sin embargo, la presencia de compuestos orgánicos no polares, que pueden ser solubilizados en el interior de la micela, suelen originar aumentos en la temperatura de *punto de nube* (43). Compuestos orgánicos polares, como alcoholes alifáticos o fenoles, disminuyen la temperatura de *punto de nube* (44, 45).

### d) Presencia de otros surfactantes

Cuando la disolución contiene dos o más surfactantes no iónicos, la temperatura a la cual tiene lugar la separación de fases es una temperatura comprendida entre las temperaturas de *punto de nube* de cada surfactante por separado, mientras que la adición de surfactantes iónicos eleva dicha temperatura, debido a que se forman micelas mixtas (46, 47).

### e) Variación de la presión

Un aumento de la presión causa un aumento de la temperatura del proceso de *punto de nube* (46, 58).

Se puede considerar, por tanto, que es posible obtener una temperatura de *punto de nube* determinada, para una aplicación analítica concreta, seleccionando las condiciones adecuadas a fin de variarla en el sentido que nos interese.

- **Relación de fases**

La relación de fases obtenida después de la separación de las mismas, determina el factor de preconcentración de los analitos, que se calcula según la siguiente fórmula:

$$\text{Factor precon.} = V_{ac} / V_s$$

donde  $V_{ac}$  es el volumen inicial de la disolución y  $V_s$  el volumen final de fase rica en surfactante. De esta manera, a medida que el volumen de fase rica en surfactante sea mayor, menor será el factor de preconcentración de los compuestos. También en este caso existen diversos parámetros que pueden modificar este factor, dentro de los cuales cabe citar:

a) Naturaleza del surfactante

La relación de fases depende de la estructura del surfactante; así, para una serie homóloga de surfactantes no iónicos de cadena polioxietilénica, el volumen de fase rica en surfactante aumenta con el aumento de la cadena oxietilénica y con el de la longitud de la cadena hidrocarbonada. Por lo que, para obtener mejores factores de preconcentración serán más convenientes surfactantes con pocas unidades oxietilénicas y de cadena corta. Sin embargo, también es fundamental tener presente su capacidad extractante, por lo que habrá que analizar a su vez si esos surfactantes son los más adecuados a la hora de extraer los solutos (59).

La fase rica en surfactante puede situarse en el fondo o en la superficie de la disolución dependiendo de las densidades relativas. Así

por ejemplo, para surfactantes como los Tritons o PONPEs, la fase rica en surfactante es más densa que la fase acuosa, por lo que aquella se sitúa en el fondo. Sin embargo, las disoluciones de surfactantes que contienen cadenas alquílicas poseen una fase rica en surfactante menos densa que la fase acuosa, por lo que se sitúan en la superficie (ej. POLE, Polidocanol) (59).

#### b) Concentración de surfactante

Para que se produzca la separación de fases es necesario que la concentración de surfactante en disolución sea superior a la *concentración micelar crítica*. Una vez superado ese valor de concentración umbral, sucede que a medida que aumenta la concentración de surfactante en la disolución, mayor es también el volumen de fase rica en surfactante, con lo que el factor de concentración disminuye (38, 39). Teniendo en cuenta que la variación en la concentración de surfactante puede afectar a la eficiencia de extracción, habrá que elegir una concentración de surfactante que nos permita extraer suficientemente los analitos, y que a su vez nos proporcione una satisfactoria preconcentración de los mismos. Además, hay que considerar el hecho de que la fase rica en surfactante presenta una viscosidad muy alta, por lo que, para concentraciones altas de surfactante, en algunas aplicaciones, es necesario añadir pequeñas cantidades de disolvente (agua, metanol, etanol, etc.) a dicha fase para disminuir la viscosidad de la misma y facilitar su manipulación (60).



### c) Adición de sales

Se ha observado que el volumen de la fase rica en surfactante no depende de la fuerza iónica (59). Sin embargo, la adición de sales provoca un aumento de la densidad de la fase acuosa, lo que facilita el proceso de separación de fases.

### d) Temperatura

Ésta debe estar siempre por encima de la temperatura de *punto de nube* para asegurar que se produzca la separación de fases. Sin embargo, un aumento considerable de la temperatura por encima de este valor provoca la disminución del volumen de fase rica en surfactante debido a la deshidratación de la misma por rotura de los puentes de hidrógeno, por lo que la cantidad de agua en esta fase disminuye (31). Esto supone una mayor preconcentración de los analitos.

El mantenimiento de una temperatura adecuada durante todo el proceso es fundamental, ya que el sistema es reversible. Es decir, que al disminuir la temperatura se produce la redisolución de la fase rica en surfactante, con lo que se perdería totalmente la preconcentración de los compuestos. De manera que será conveniente realizar la centrifugación "en caliente", a una temperatura dada.

### e) Tiempo

Al igual que ocurre con la temperatura, si se prolonga demasiado el tiempo de calentamiento, se produce una disminución del volumen de

fase rica en surfactante, debido también a un proceso de deshidratación (31).

- **Solubilización (extracción) de analitos**

En cuanto a los parámetros que pueden afectar al proceso de solubilización de los diferentes analitos en la disolución micelar, y que por tanto tendrán influencia en los porcentajes de recuperación (eficiencia de extracción del proceso) obtenidos al aplicar la extracción por *punto de nube*, destacan:

a) Naturaleza del surfactante.

La eficiencia de extracción vendrá determinada por las interacciones entre soluto y micela que, como se vio anteriormente, pueden ser de tipo electrostático, hidrofóbico o una combinación de ambos. Generalmente, la mayoría de los compuestos orgánicos contaminantes de interés medioambiental suelen ser muy poco polares, de manera que será más interesante trabajar con aquellos surfactantes de menor polaridad.

El carácter polar de un surfactante no iónico aumenta al aumentar el número de unidades etilénicas en su estructura (ej. es más polar el POLE,  $C_{12}E_{10}$ , que el Polidocanol,  $C_{12}E_9$ ) y al disminuir la longitud de la cadena alquílica. Los surfactantes más hidrofóbicos serán aquellos que tengan un menor número de unidades oxietilénicas y las cadenas hidrocarbonadas más largas. Por otra parte, el grado de partición de las moléculas orgánicas neutras es mayor en surfactantes hidrofóbicos; por tanto, los surfactantes que teniendo el mismo grupo alquílico tengan un menor número de unidades oxietilénicas tendrán una mayor capacidad de extraer solutos. A igualdad en el número de unidades etilénicas, aquellos que posean una mayor cadena alquílica serán los mejores extractantes. Por tanto, el mejor surfactante, desde el punto de vista de la

extracción, será aquel que tenga pocas unidades oxietilénicas y cadenas hidrocarbonadas largas (59). Si embargo, este tipo de surfactantes no nos proporcionaría buenos factores de concentración, como vimos anteriormente. Por tanto, hay que elegir entre ambos criterios para maximizar la extracción y la concentración de los analitos.

#### b) Concentración de surfactante.

Generalmente, al aumentar la concentración de surfactante en disolución, el porcentaje de extracción de los solutos aumenta hasta un punto a partir del cual la eficiencia de extracción se estabiliza y permanece constante. Esta variación suele ser más evidente para los analitos más polares, ya que los solutos más hidrofóbicos se extraen muy bien, incluso con concentraciones de surfactante bajas. Sin embargo, una concentración muy grande se traduce en un pequeño factor de preconcentración, ya que aumenta el volumen de la fase rica en surfactante. Por lo que habrá que escoger un porcentaje de surfactante que permita una extracción eficiente y a la vez una adecuada preconcentración de los compuestos de interés.

#### c) Adición de sales.

Al aumentar la concentración de sal en disolución el tamaño de las micelas y su número de agregación aumentan, mientras que su concentración micelar crítica permanece constante (61). Por otro lado, al aumentar la fuerza iónica de la fase acuosa, los analitos no polares se vuelven más insolubles en la disolución, es decir, que presentarán mayor afinidad por la disolución micelar, lo que mejora la eficiencia de

extracción de estos compuestos. Este efecto es conocido como "salting-out" y se ha empleado en numerosos estudios para mejorar la eficiencia de extracción (62-64).

d) Temperatura de equilibración.

Como se vio en apartados anteriores, la temperatura a que se somete la muestra tiene que ser siempre superior a la temperatura de *punto de nube*. Por lo general, se elige una temperatura de 15 a 20° C por encima de la temperatura de *punto de nube* para asegurar que el proceso tenga lugar (59). Sin embargo, algunos surfactantes con temperaturas de *punto de nube* demasiado elevadas pueden ocasionar problemas de estabilidad en analitos termolábiles, con lo que los porcentajes de extracción pueden disminuir. En estos casos hay que elegir adecuadamente el surfactante o bien, añadir los aditivos adecuados para modificar su temperatura de *punto de nube*.

e) Tiempo de equilibración.

Es el tiempo que permanece la muestra bajo las condiciones en las que se establece la separación de fases. Durante este tiempo se produce la interacción entre el soluto y la micela. Dependiendo del tipo de soluto y del tipo de surfactante se necesitará más o menos tiempo para que se produzca la solubilización del analito. Sin embargo, en la mayoría de los trabajos publicados se considera que tiempos de equilibración superiores a 30 minutos no mejoran la extracción (65).

f) pH de la disolución.

Este factor es importante sólo cuando los solutos a extraer presentan diferentes características en forma ácida o básica. La forma iónica de una molécula neutra no interacciona tan fuertemente con las micelas como lo hace su forma neutra, por lo que habrá que ajustar el pH de la disolución para que los solutos no se encuentren ionizados (59). En el caso de los pesticidas organofosforados, será una variable a tener en cuenta mientras que para las dioxinas no, ya que no presentan formas iónicas.

## II.2 CARACTERIZACIÓN DE SURFACTANTES

En la presente Tesis Doctoral se hará uso de los surfactantes: Polioxietilén 10 Lauril Éter (POLE) y Oligoetilén Glicol Monoalquil Éter (Genapol X-080). Ambos, pertenecen al grupo de surfactantes no iónicos, por lo que ofrecen la posibilidad de ser utilizados mediante la metodología de *punto de nube* para extraer y preconcentrar los analitos de interés.

Estructuralmente cabe destacar que ambos surfactantes poseen el mismo número de grupos alquílicos pero diferente número de grupos oxietilénicos. El POLE es  $C_{12}E_{10}$ , mientras que el Genapol X-080 es un  $C_{12}E_n$ , siendo  $n$  una constante que difiere según el proceso de fabricación del mismo y que oscila en torno a 8, esto es debido a los problemas que presenta la síntesis de este tipo de surfactantes (66). Esta diferencia, como vimos, anteriormente afecta a la polaridad, en el sentido de que a mayor número de grupos oxietilénicos mayor es la polaridad del surfactante, por lo que en este caso, podemos aceptar que el POLE es un surfactante más polar que el Genapol X-080.

### II.2.1 Temperatura de *punto de nube*. Diagrama de Fases.

Las temperaturas de punto de nube del POLE y Genapol X-080 son bien conocidas y oscilan entre  $95\pm 5$  y  $75\pm 5^\circ\text{C}$  respectivamente (67). Puesto que la temperatura de trabajo debe ser superior a la temperatura de punto de nube, se decidió añadir NaCl, un electrolito que permite la disminución de la misma, de forma que se pueda trabajar y aplicar este método en condiciones de calentamiento menos agresivas y disminuir el consumo energético.

A fin de determinar el efecto de adición de la sal (NaCl) en la temperatura de *punto de nube* de estos surfactantes, se calentaron una serie de disoluciones,

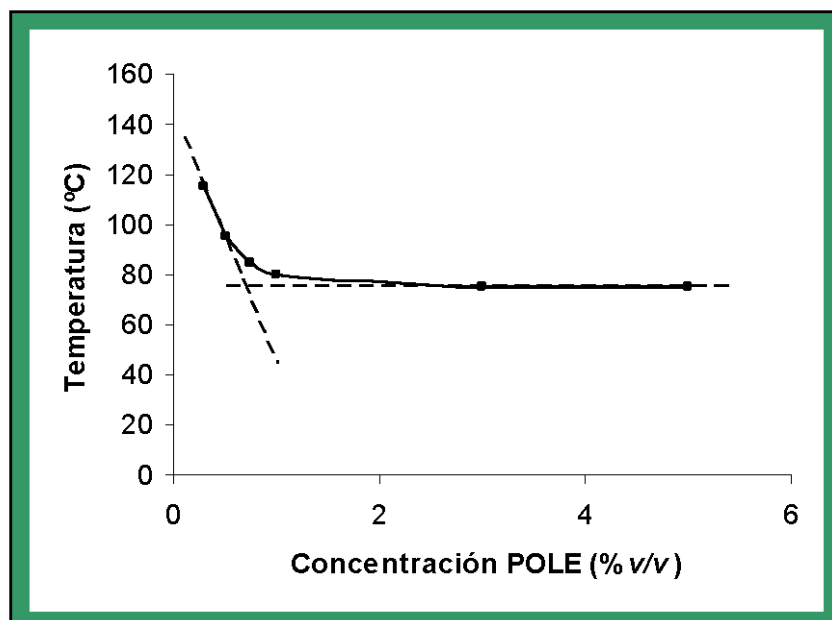
conteniendo POLE (2%, v/v) o Genapol X-080 (2%, v/v) y NaCl en diferentes concentraciones que variarán entre 1-15% (m/v), aumentando la temperatura de forma gradual hasta que se observase la separación de las dos fases. Los resultados mostraron un comportamiento muy similar en ambos casos de manera que la temperatura de la separación de fases iba disminuyendo con el incremento en la concentración de sal hasta un punto, por encima del cual se mantenía constante. Por lo que se fijaron porcentajes de NaCl en esa zona de estabilidad, correspondientes a 7.5% (m/v) y 5% (m/v) en NaCl para el POLE y Genapol X-080 respectivamente.

Posteriormente, se determinaron la temperatura y concentración de *punto de nube* para cada surfactante con los porcentajes de NaCl fijados. Estos parámetros se obtienen a partir del diagrama de fases, en el que se representa la temperatura a la cual se obtiene la separación de fases, frente a la concentración de surfactante presente en la disolución. La intersección de las tangentes a la curva obtenida nos da un punto cuyas coordenadas corresponden a la temperatura y concentración de punto de nube de ese surfactante. Para ello, se prepararon disoluciones de POLE y Genapol X-080 con diferentes concentraciones variando desde 0.1 hasta 5%(v/v) junto con NaCl (7,5 y 5% m/v en cada caso), y se calentaron a distintas temperaturas hasta obtener la separación de fases. Del diagrama de fases obtenido en cada caso se obtuvieron temperaturas de *punto de nube* de  $75\pm 5^{\circ}\text{C}$  y  $65\pm 5^{\circ}\text{C}$  para el POLE y Genapol X-080 respectivamente, que representan unos descensos de 15 y  $10^{\circ}\text{C}$  respecto de la temperaturas de punto de nube en ausencia de sal de dichos surfactantes (67). En la Figura II.2, se muestra el diagrama de fases obtenido para el POLE.

Además de esta importante ventaja observada para ambos surfactantes, puesto que los sistemas se someten de esta forma a temperaturas menos agresivas, se pudo apreciar que la estabilidad de la separación de las dos fases, mejoró considerablemente en presencia de sal, de forma que las capas

permanecían separadas a temperatura ambiente durante más de una hora después de su centrifugado, ralentizando el proceso reversible de mezcla de ambas fases que se produce cuando dichos sistemas se enfrían.

Figura II.2.- Diagrama de fases del Polioxietilén 10 Lauril Éter (POLE) en presencia de NaCl (7.5 %  $m/v$ ).



### II.2.2 Relación de fases. Factor de preconcentración.

La relación de fases, definida como el cociente entre el volumen de la disolución acuosa a ser preconcentrada ( $V_w$ ) y el volumen de fase rica en surfactante ( $V_s$ ), es decir ( $V_w/V_s$ ), es un parámetro que indica la preconcentración a que pueden ser sometidos los analitos de interés con cada surfactante. Este parámetro, aumenta a medida que disminuye la concentración de surfactante, ya



que a medida que la concentración de surfactante es menor, también el volumen de fase rica en surfactante es inferior.

Se determinó pues la relación de fases de cada surfactante, POLE y Genapol X-080, en presencia de la cantidad de NaCl fijada. Para ello se tomaron las medidas de los volúmenes de ambas fases en diferentes disoluciones con distinta concentración de surfactante (0.5-10% *v/v*). Las disoluciones, introducidas en tubos graduados y con cierre hermético, se calentaron durante 10 minutos en un baño termostatzado a 90°C y 80°C para el POLE y Genapol X-080 respectivamente, y se centrifugaron a 3500 r.p.m. durante 5 min. Posteriormente, el volumen de la fase rica en surfactante fue medido en el tubo graduado. Las disoluciones fueron sometidas a unas temperaturas algo superiores que las temperaturas de *punto de nube* de cada surfactante para asegurar la separación de fases.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla II.3 donde se observa, para ambos surfactantes, que a medida que aumenta la concentración de surfactante disminuye el valor de la relación de fases, lo que conduce a menores factores de preconcentración.

Una preconcentración demasiado elevada puede no ser tan conveniente debido a lo delicado de la medida y manipulación de un volumen de surfactante tan pequeño, así por ejemplo, en el caso del POLE, la fase rica en surfactante dejó de ser detectable para concentraciones de surfactante inferiores al 1% (*m/v*). De manera que para establecer una relación adecuada entre la concentración de surfactante en la disolución (extracción) y la fase de surfactante a extraer (preconcentración), se fijó una concentración de surfactante del 5% (*m/v*) en cada caso, mediante la cual se obtienen factores de preconcentración de 10 y 12.5 veces para el POLE y Genapol X-080 respectivamente.

**Tabla II.3.-** Relación de fases para los surfactantes POLE y Genapol X-080.

Surfactante	Concentración surfactante (%, v/v)	$V_w/V_s$
POLE	0.5	---
	1	25
	3	16.7
	5	10
	8	7.1
	10	5.6
Genapol X-080	0.5	50
	1	25
	3	16.7
	5	12.5
	7.5	7.1

### II.3 EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE DIBENZO-P-DIOXINAS

Las dioxinas son compuestos muy tóxicos y por lo tanto nocivos para la salud y altamente perjudiciales al medioambiente. Su principal vía de formación es por combustión y al ser emitidos a la atmósfera sufren un transporte global, por lo que se encuentran presentes en todo tipo de muestras. Sin embargo, no existe mucha bibliografía referente al análisis de dioxinas en agua ya que, debido a la baja solubilidad que presentan en este medio, suelen encontrarse fuertemente adheridas al material particulado. Eso hace que la concentración de dioxinas en agua sea extremadamente baja lo que dificulta el análisis en este tipo de matrices. Por ello, además de la utilización de sistemas de detección de alta sensibilidad, es imprescindible el desarrollo de técnicas de extracción que permitan la preconcentración de las mismas, como es el caso de la metodología de extracción por *punto de nube*.

#### II.3.1 Optimización de la extracción de dioxinas en agua

##### **Efecto de la concentración de surfactante**

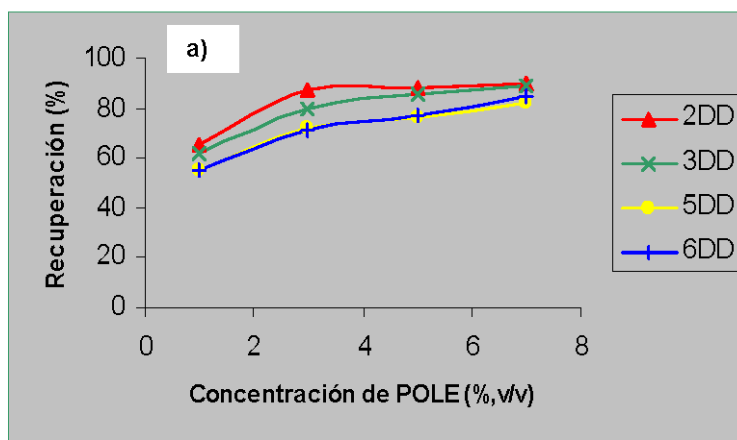
Ésta es una variable que puede afectar a la eficiencia con la que se extraen los compuestos ya que la forma y tamaño de las micelas puede variar dependiendo del tipo de surfactante y de su concentración en la disolución (68). La interacción del surfactante con los analitos puede cambiar en función de la alteración que sufra la organización de dicha estructura, afectando a la eficiencia de extracción del proceso.

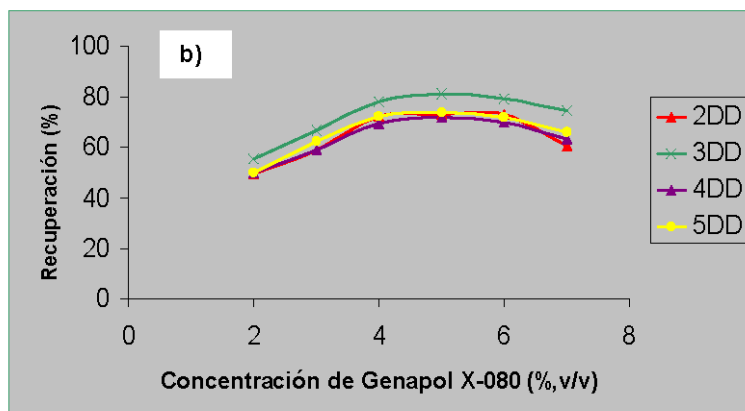
Con objeto de estudiar este efecto en la extracción de dioxinas, se realizaron análisis de distintas muestras conteniendo la mezcla de dioxinas bajo

estudio, distintas proporciones de los surfactantes POLE y Genapol X-080 en un rango de 1 ó 2 a 7% (v/v) y sal en porcentajes de 7.5 y 5% (m/v) respectivamente.

Los resultados mostraron un comportamiento similar para todos los compuestos cuando se extraen con ambos surfactantes. A bajas concentraciones de surfactante la eficiencia de extracción es también menor, incrementándose gradualmente con la concentración de surfactante en la disolución hasta el 3-5% (v/v), momento a partir del cual las recuperaciones tienden a estabilizarse, como ocurre en el caso del POLE, o incluso a descender ligeramente, como sucede en el caso del Genapol X-080. En la Figura II.3 se muestran los resultados obtenidos para alguna de las dioxinas en estudio.

Figura II.3.- Efecto de la concentración de surfactante en la extracción de dioxinas de muestras acuosas.





Teniendo en cuenta lo anterior, se fijaron concentraciones de surfactante del 5% (v/v) en ambos casos para los estudios posteriores. Bajo estas condiciones, el factor de preconcentración de las dioxinas es de 10 veces. Sin embargo, debido a la alta concentración de surfactante en el extracto, que da lugar a una señal muy intensa al inicio del cromatograma y que interfiere con las dioxinas DD y 1DD, se decidió añadir 1mL de agua, a fin de poder determinar dichas dioxinas. De forma que, la determinación de estos compuestos es posible bajo un factor de preconcentración de 5 veces.

#### Efecto de la adición de sal

La presencia de sales tales como el cloruro sódico (NaCl) en disoluciones de surfactantes no iónicos puede alterar algunos de los parámetros característicos de los mismos. Así por ejemplo, provoca la disminución de la temperatura de punto de nube, lo que puede resultar muy conveniente si se trabaja con compuestos altamente volátiles, además de suponer un ahorro energético. Por otro lado, como se vio anteriormente, también facilita la separación de fases y la estabilidad de la fase de surfactante, ya que al aumentar la densidad de la fase acuosa, aquellas permanecen separadas durante más tiempo, incluso a temperatura ambiente donde, de otro modo,

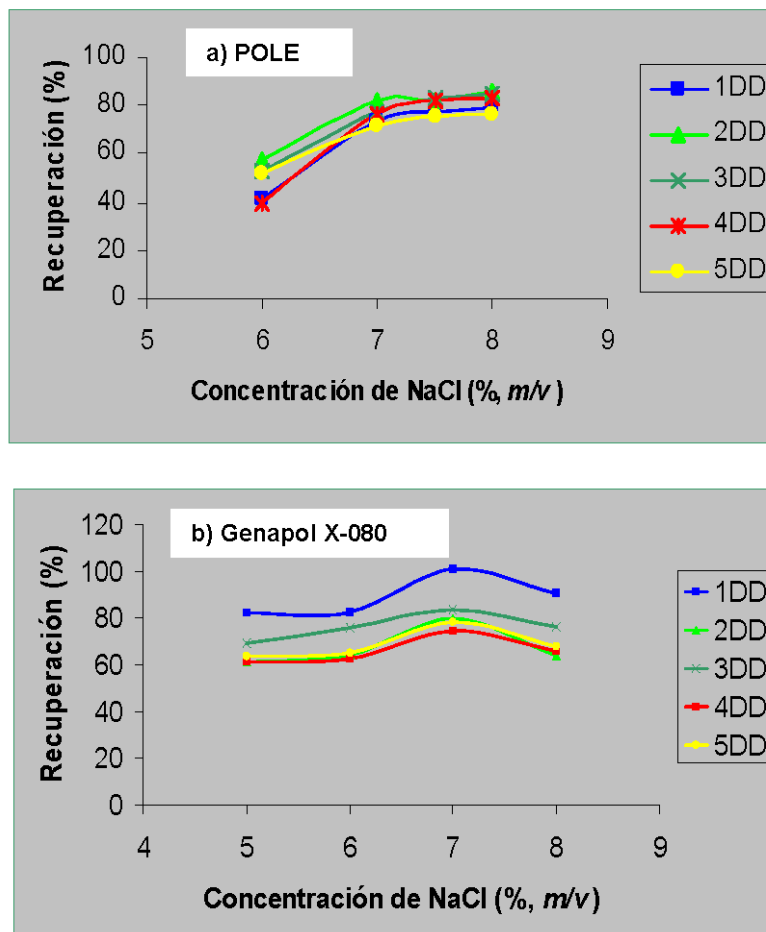
habrían vuelto a mezclarse. A parte de ello, también puede afectar a la eficiencia de extracción de los analitos.

Con el fin de determinar el efecto de esta variable en el proceso de extracción de las dioxinas, se realizaron análisis de diferentes disoluciones de POLE y Genapol (5%, v/v), conteniendo la mezcla de dioxinas en estudio y diferentes concentraciones de sal variando de 6 a 8% (w/v) NaCl en el caso del POLE y de 5 a 8 % (w/v) en el caso del Genapol X-080. Respecto a esta diferencia del rango de estudio hay que señalar que en el caso del POLE, y como se vio anteriormente, la separación de fases en concentraciones bajas de sal se produce a temperaturas muy elevadas, concretamente para concentraciones iguales o inferiores al 5% (w/v) la separación de fases tiene lugar a más de 100°C, por lo que no se consideró en este estudio.

Los resultados obtenidos indicaron en ambos casos un incremento notable de los porcentajes de recuperación hasta el 7% (w/v) de NaCl para todos los analitos en estudio, después del cual o bien permanecen constantes como sucede en el caso del POLE, o bien decrecen ligeramente como ocurre cuando se emplea Genapol X-080. A la vista de estos resultados, se establecieron porcentajes de NaCl de 7.5 y 7% (w/v) respectivamente para los estudios posteriores.

En la Figura II.4 se muestra el comportamiento obtenido con cada surfactante, POLE y Genapol X-080 respectivamente, con algunas de las dioxinas en estudio.

Figura II.4.- Efecto de la concentración de NaCl en la extracción de dioxinas de muestras acuosas.



### Efecto del tiempo de equilibración

Se denomina tiempo de equilibración al tiempo necesario para que se produzca la interacción entre el soluto y la micela, es decir el tiempo en que la muestra está sometida a la temperatura de trabajo, que suele ser algo superior a la temperatura de punto de nube del surfactante que se esté empleando. Esta variable puede afectar a la eficiencia de extracción debido a que un tiempo de

calentamiento excesivo puede provocar la deshidratación de la fase rica en surfactante, y un tiempo demasiado corto puede provocar que no se produzca la equilibración. Generalmente el tiempo de equilibración suele ser superior a 10 minutos e inferior a 30 minutos, ya que tiempos más largos no mejoran la extracción.

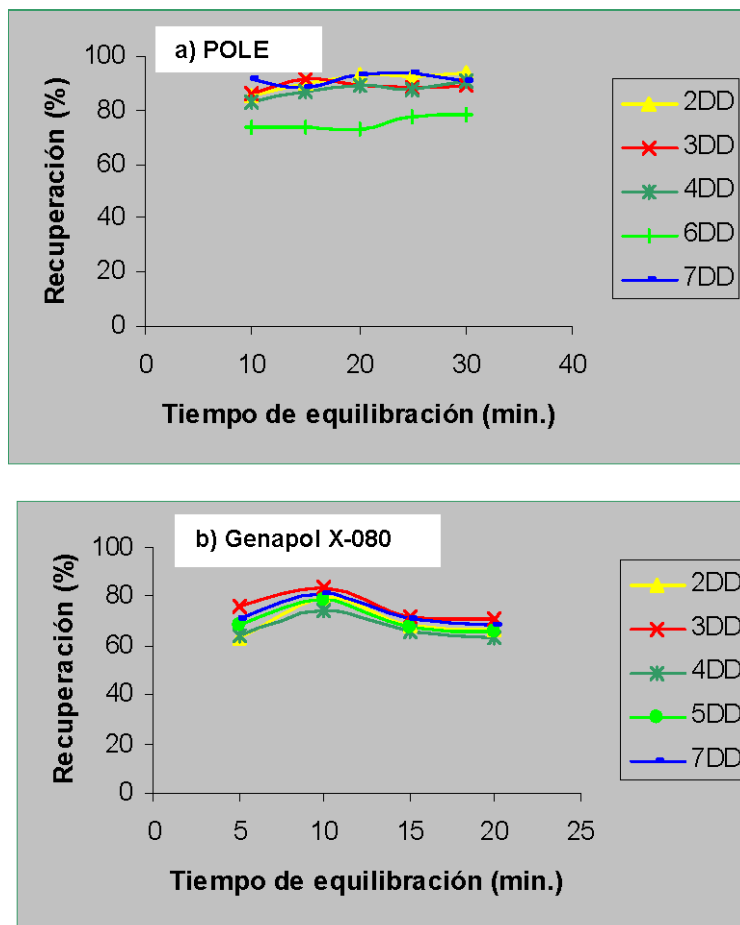
En este caso, estudiamos el efecto del tiempo de equilibración en la extracción de dioxinas analizando una serie de disoluciones de ambos surfactantes; POLE y Genapol X-080 al 5% (v/v), conteniendo la mezcla de dioxinas en estudio y NaCl en concentraciones 7.5 y 7% (m/v) respectivamente, después de su calentamiento durante diferentes periodos de tiempo desde 10 hasta 30 minutos en el caso del POLE y desde 5 hasta 20 minutos en el caso del Genapol X-080.

Los resultados obtenidos (Figura II.5) muestran una respuesta diferente para cada surfactante. Si bien en el caso del POLE no se observan diferencias significativas en las recuperaciones de los analitos bajo estudio con la variación del tiempo, en el caso del Genapol X-080 se encuentra una disminución de la recuperación después de los 10 minutos por lo que se amplió el estudio a fin de determinar el comportamiento por debajo de ese tiempo. Como se puede apreciar, un tiempo de equilibración de 5 minutos es insuficiente para la correcta extracción de los compuestos, siendo éste óptimo en torno a los 10 minutos.

De esta forma se establecieron tiempos de equilibración de 15 y 10 minutos para el POLE y Genapol X-080 respectivamente.



Figura II.5.- Efecto del tiempo de equilibración en la extracción de dioxinas de muestras acuosas.

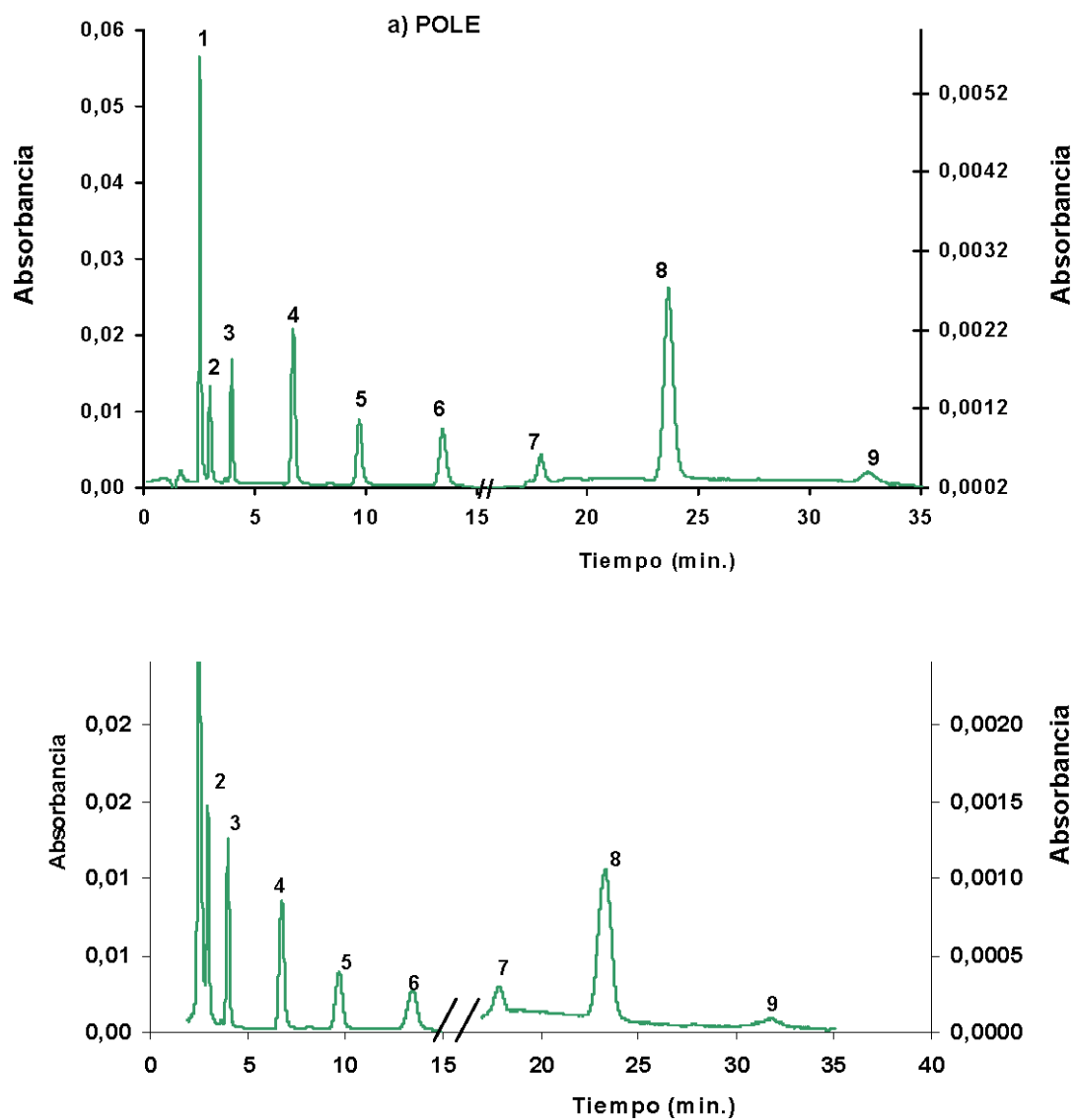


### II.3.2 Parámetros analíticos y Validación del método.

Una vez optimizadas las condiciones de extracción de las dioxinas en estudio y a fin de determinar la reproducibilidad del método, éste se aplicó al análisis de seis 6 muestras enriquecidas con  $200 \text{ ng.mL}^{-1}$  de la mezcla de dioxinas. Para ello se extrajeron las dioxinas bajo la metodología de *punto de nube* empleando POLE o Genapol X-080 como extractante, y se analizaron los

extractos en el sistema HPLC-UV en las condiciones cromatográficas previamente establecidas. La Figura II.6 muestra los cromatogramas obtenidos para la mezcla de dioxinas con POLE y Genapol X-080 respectivamente.

Figura II.6.- Cromatogramas de la mezcla de dioxinas bajo estudio en presencia de los surfactantes POLE y Genapol X-080.



En ellas puede observarse cómo se obtiene una separación adecuada de todas las dioxinas en el tiempo de análisis. La cuantificación de los extractos se llevó a cabo a partir de las curvas de calibrado recogidas en la Tabla A.3 del Anexo I de la presente Tesis Doctoral.

Las desviaciones estándar relativas obtenidas se muestran en la Tabla II.4, donde se observan valores inferiores a 2.43 y 8.57% para el POLE y Genapol X-080 respectivamente. Estos valores son muy similares a los obtenidos con otros métodos de extracción/preconcentración como la extracción en fase sólida que emplea discos C<sub>18</sub> para la extracción de dioxinas de efluentes (14).

Por otro lado se calcularon los límites de detección para cada analito empleando la relación señal ruido ( $s/n=3$ ) (69) Los resultados obtenidos para los analitos preconcentrados también se muestran en la Tabla II.4.

#### *Extracción de dioxinas por la técnica Líquido-Líquido (LLE)*

A fin de comparar el método de punto de nube propuesto utilizando POLE como extractante con otro convencional, se analizó una muestra de agua enriquecida con la mezcla de dioxinas en estudio, mediante la extracción líquido-líquido y determinación HPLC-UV. La Figura II.7, muestra los cromatogramas obtenidos por ambos métodos, donde se observa que ambos permiten una extracción satisfactoria de todos los compuestos bajo estudio.

**Tabla II.4.-** Recuperaciones y parámetros analíticos del método de extracción *punto de nube* cuando se emplean POLE y Genapol X-080 en la extracción de dioxinas en muestras acuosas.

Compuesto	POLE			Genapol X-080		
	% Rec. <sup>a</sup>	R.S.D. <sup>b</sup> (%)	L.O.D. <sup>c</sup> (ng.mL <sup>-1</sup> )	% Rec. <sup>a</sup>	R.S.D. <sup>b</sup> (%)	L.O.D. <sup>c</sup> (ng.mL <sup>-1</sup> )
DD	87.3	0.2	13.9 <sup>d</sup>	---	---	---
1DD	73.2	0.2	9.8 <sup>d</sup>	58.8	2.0	7.2 <sup>d</sup>
2DD	83.9	0.2	0.0 <sup>e</sup>	75.4	1.9	0.5 <sup>f</sup>
3DD	83.6	2.4	1.6 <sup>e</sup>	80.9	1.4	0.2 <sup>f</sup>
4DD	84.3	0.3	0.0 <sup>e</sup>	70.5	2.2	0.7 <sup>f</sup>
5DD	77.1	0.1	0.0 <sup>e</sup>	71.2	2.3	0.6 <sup>f</sup>
6DD	74.7	0.4	0.2 <sup>e</sup>	101.1	5.8	0.6 <sup>f</sup>
7DD	91.6	0.1	0.0 <sup>e</sup>	80.1	3.3	0.3 <sup>f</sup>
8DD	82.9	0.6	0.3 <sup>e</sup>	103.8	8.6	9.1 <sup>f</sup>

<sup>a</sup> \_ Porcentaje de Recuperación.

<sup>b</sup> \_ Desviación estándar relativa.

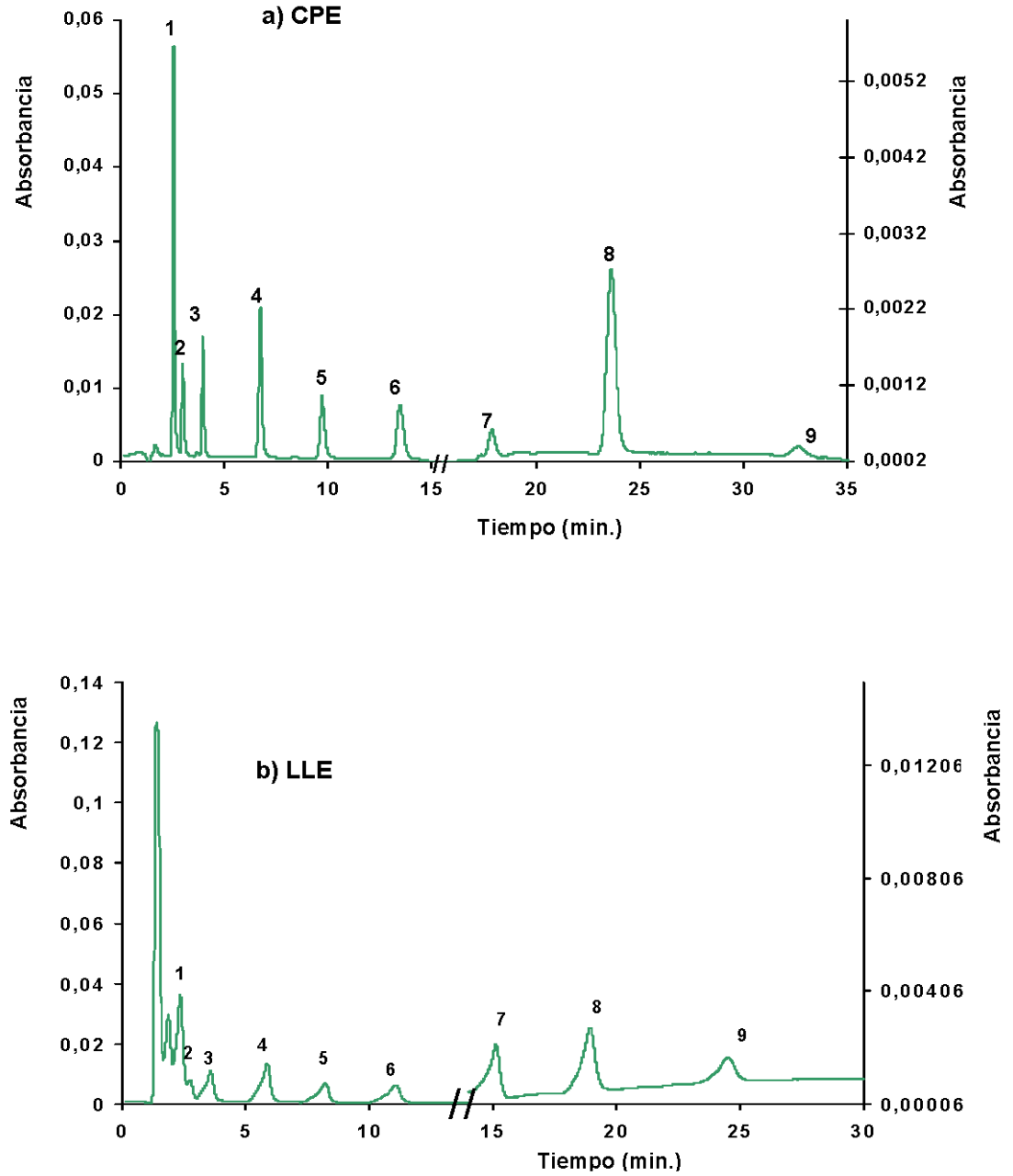
<sup>c</sup> \_ Límite de detección después de aplicar el método Punto de nube.

<sup>d</sup> \_ Factor de preconcentración de 5 veces.

<sup>e</sup> \_ Factor de preconcentración de 10 veces.

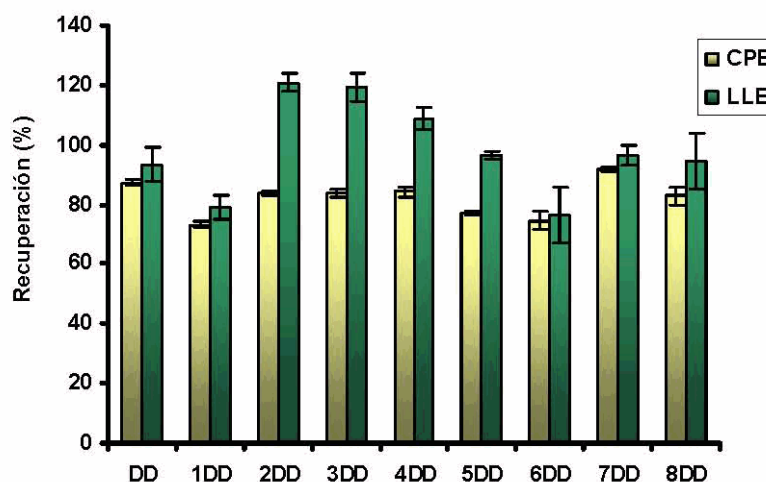
<sup>f</sup> \_ Factor de preconcentración de 12.5 veces.

Figura II.7.- Cromatogramas de un extracto de dioxinas de una muestra acuosa obtenidos mediante diferentes técnicas de extracción.



Para la cuantificación en ambos métodos se utilizaron las curvas de calibrado recogidas en la Tabla A.5 del Anexo I y los resultados obtenidos se recogen en la Figura II.8. En ella puede observarse que los resultados son comparables por ambos métodos. Por tanto, podemos afirmar que la extracción mediante la metodología de punto de nube es una alternativa válida a los métodos de extracción convencionales.

Figura II.8.- Comparación de los resultados obtenidos por las distintas técnicas de extracción en la recuperación de dioxinas de muestras acuosas.



### II.3.3 Aplicación a otras muestras acuosas

El interés del desarrollo de nuevas metodologías de análisis de contaminantes radica no sólo en la mejora de los métodos tradicionales, sino también en la posibilidad de aplicar dichas metodologías al análisis de todo tipo

de muestras reales, de manera que la nueva metodología propuesta sea lo más universal posible. Con este objeto aplicamos el método CPE desarrollado a diferentes muestras líquidas de aguas de diferente contenido salino, diferente procedencia y diferente tratamiento, con el objeto de determinar la eficiencia de dicho método ante muestras más complejas.

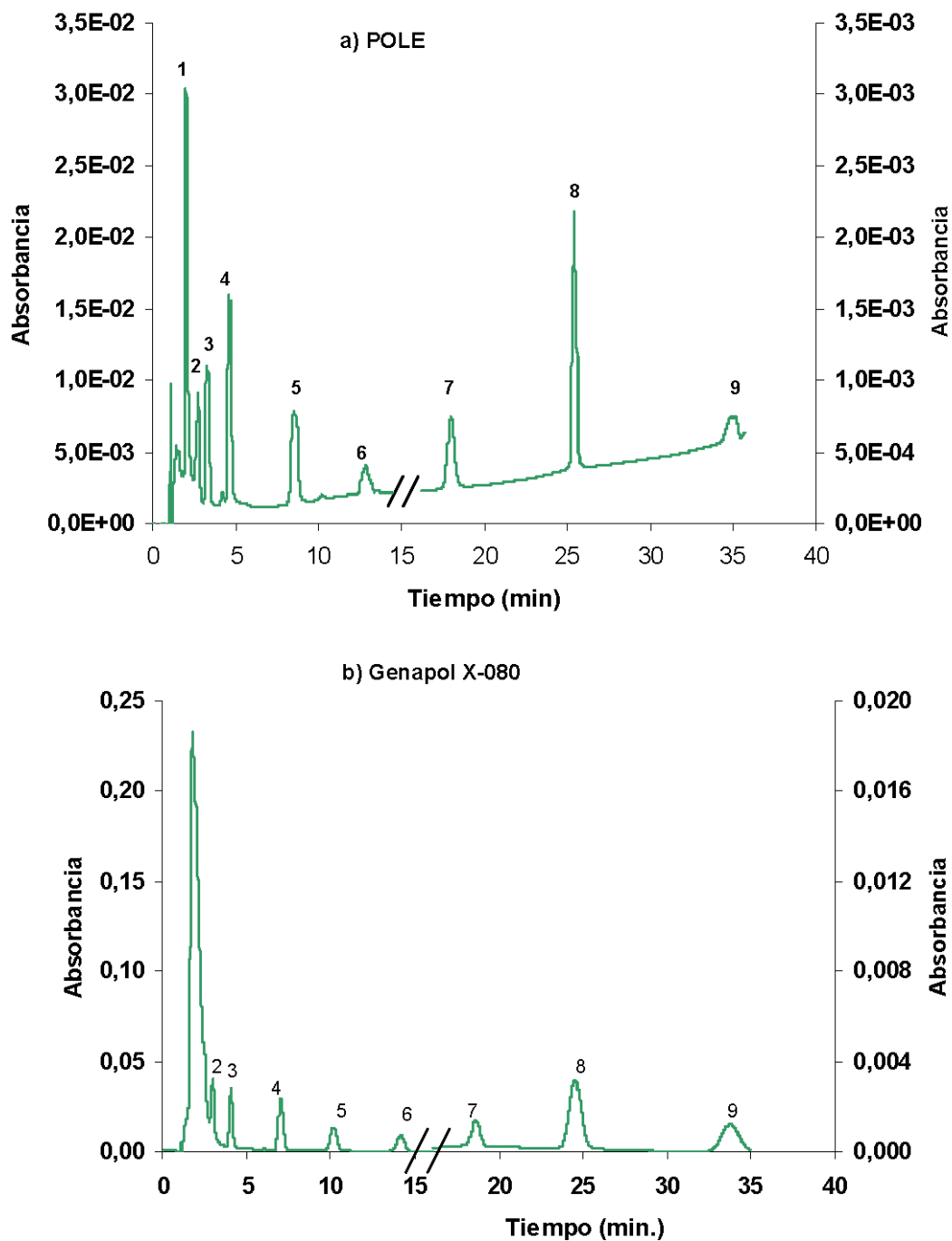
Por ello, el método propuesto fue aplicado a las muestras que se describen a continuación:

- dos muestras de agua dulce y diferente tratamiento: una depurada y otra potabilizada,
- dos muestras de agua salobre con diferente salinidad: una tomada de un sondeo cercano a la costa con una conductividad de 30.7 mS y otra tomada de un pozo más alejado de la costa con una conductividad de 19.7 mS, ambas en la isla de Gran Canaria y
- dos muestras de agua de mar tomadas de distintas zonas costeras de la isla de Gran Canaria (Islas Canarias, España): una del sureste (SE) y otra del suroeste (SO) de la misma.

Después de comprobar la ausencia de dioxinas en las muestras, éstas fueron acondicionadas con las dioxinas en estudio en concentraciones diferentes (128 y 208 ng.mL<sup>-1</sup>) para posteriormente aplicarles el método de extracción y análisis propuesto usando POLE como extractante.

En la Figura II.9 se muestran los cromatogramas correspondientes a un extracto de la mezcla de dioxinas después de aplicar la extracción CPE con POLE a una muestra de agua salobre de baja salinidad y a una muestra de agua Milli-Q cuando se emplea Genapol X-080 como extractante.

**Figura II.9.-** Cromatogramas de la aplicación de la metodología CPE a la extracción de una mezcla de dibenzo-p- dioxinas policloradas presentes en: a) Una muestra de agua salobre de baja salinidad y b) una muestra de agua Milli-Q empleando los surfactantes POLE y Genapol X-080 respectivamente.





Los resultados obtenidos para todas las muestras se recogen en las Tablas II.6 y II.7 para POLE y Genapol X-080 respectivamente, donde porcentajes de recuperación entre 75 y 109% fueron observados en la mayoría de los casos. Desde el punto de vista analítico, los resultados fueron bastante satisfactorios y no se observaron diferencias significativas debidas al diferente contenido salino (agua dulce, salada o salobre), tampoco por su diferente procedencia (SE o SO), ni por haber sido tratadas de diferente forma (agua depurada y potabilizada). Lo que demuestra la validez del método desarrollado en cuanto a la aplicabilidad del mismo en todas las muestras acuosas analizadas.

**Tabla II.6.-** Porcentajes de recuperación obtenidos en la determinación de dioxinas extraídas de diferentes muestras acuosas con distinto contenido salino<sup>a</sup>. (Concentración de dioxinas añadida: 128 ng.mL<sup>-1</sup>).

Compuesto	Agua dulce 1	Agua dulce 2	Agua salobre 1	Agua salobre 2	Agua de mar 1	Agua de mar 2
DD	90.1±1.1	75.2±1.3	94.4±0.4	90.2±2.9	93.1±0.7	90.4±0.9
1DD	77.2±1.6	72.4±1.0	77.6±1.6	71.3±2.8	81.4±2.0	77.4±1.9
2DD	94.5±0.8	91.4±1.9	92.5±2.5	92.3±1.4	96.0±2.4	91.4±1.9
3DD	89.5±2.5	82.1±0.7	85.9±0.9	82.7±1.6	85.0±2.5	82.1±2.0
4DD	81.7±0.7	81.0±0.5	81.9±0.3	80.2±2.0	84.4±1.0	81.0±0.8
5DD	83.6±0.9	82.9±1.3	84.6±0.2	81.6±1.3	84.3±1.3	82.9±1.4
6DD	84.0±0.9	81.5±1.2	81.8±0.6	81.0±1.8	83.8±1.2	81.5±1.3
7DD	105.1±0.4	109.8±1.1	107.0±0.1	106.9±1.9	108.8±3.4	109.8±2.0
8DD	98.4±2.6	96.6±1.7	101.2±0.8	97.0±2.1	98.5±0.2	96.6±0.4

<sup>a</sup> Media de tres determinaciones.

<sup>b</sup> Aguas dulces: 1) Depurada, 2) Potable.

<sup>c</sup> Aguas salobres: 1) De alta salinidad, 2) De baja salinidad.

<sup>d</sup> Aguas de mar: 1) SE de Gran Canaria, 2) SO de Gran Canaria.

Tabla II.7.- Porcentajes de recuperación obtenidos en la determinación de dioxinas extraídas de diferentes muestras acuosas con distinto contenido salino<sup>a</sup>. (Concentración de dioxinas añadida: 208 ng.mL<sup>-1</sup>).

Compuesto	Agua dulce 1	Agua dulce 2	Agua salobre 1	Agua salobre 2	Agua de mar 1	Agua de mar 2
DD	79.2±0.7	94.0±0.9	81.5±1.0	87.3±3.0	108.9±1.8	87.0±1.5
1DD	64.8±2.2	74.9±0.7	79.2±3.2	73.0±1.4	97.0±0.1	70.6±0.8
2DD	81.2±1.0	87.9±2.9	93.1±1.0	94.1±1.4	108.7±0.7	88.9±0.5
3DD	76.5±0.3	81.3±0.5	84.4±0.2	81.8±0.7	97.9±0.2	83.9±0.6
4DD	75.7±0.4	82.0±0.2	85.6±0.4	84.7±1.1	102.1±1.1	85.7±1.2
5DD	71.3±1.3	76.7±0.4	80.4±0.9	79.9±1.9	90.7±0.2	77.3±0.7
6DD	66.7±2.6	80.8±0.2	73.2±0.6	75.3±0.5	78.6±2.1	68.6±1.9
7DD	83.3±1.6	99.7±0.1	99.8±0.1	101.4±1.8	103.9±1.4	92.9±1.5
8DD	86.1±2.8	101.6±0.9	81.4±1.0	86.3±0.3	81.3±0.7	83.0±1.0

<sup>a</sup> Media de tres determinaciones.

<sup>b</sup> Aguas dulces: 1) Depurada, 2) Potable.

<sup>c</sup> Aguas salobres: 1) De alta salinidad, 2) De baja salinidad.

<sup>d</sup> Aguas de mar: 1) SE de Gran Canaria, 2) SO de Gran Canaria.

## II.4 EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE PESTICIDAS

Los pesticidas organofosforados son compuestos insecticidas altamente tóxicos que se utilizan de forma extensiva en la agricultura. Su aplicación por fumigación (vía aérea), o disueltos en agua vía foliar o riego (vía terrestre), hace se encuentran presentes en todo tipo de muestras. Además, al ser más polares que los pesticidas organoclorados, su transporte en el medio a menudo viene asociado al de las aguas contaminadas, lo que hace imprescindible su análisis para el control de la contaminación. Sin embargo, se presenta el inconveniente de que estos compuestos normalmente están altamente diluidos en las muestras acuosas. Por lo que además de la utilización de sistemas de detección altamente sensibles, se hace necesario el desarrollo de técnicas de extracción que permitan la preconcentración de los compuestos con la mínima manipulación posible. Éste es el caso de la metodología de extracción por *punto de nube*.

### II.4.1 Optimización de la extracción de pesticidas organofosforados en agua

De igual forma que se optimizaron las condiciones para la extracción de las dioxinas mediante la metodología de punto de nube, se siguió el mismo procedimiento para optimizar los parámetros que influyen en la eficacia de la recuperación para la extracción de los pesticidas organofosforados en estudio utilizando esta metodología.

#### **Efecto de la concentración de surfactante**

Como se vio anteriormente, la concentración de surfactante es un parámetro decisivo en el estudio de la eficiencia de extracción del método, debido al cambio que sufren el tamaño y la forma de las micelas.

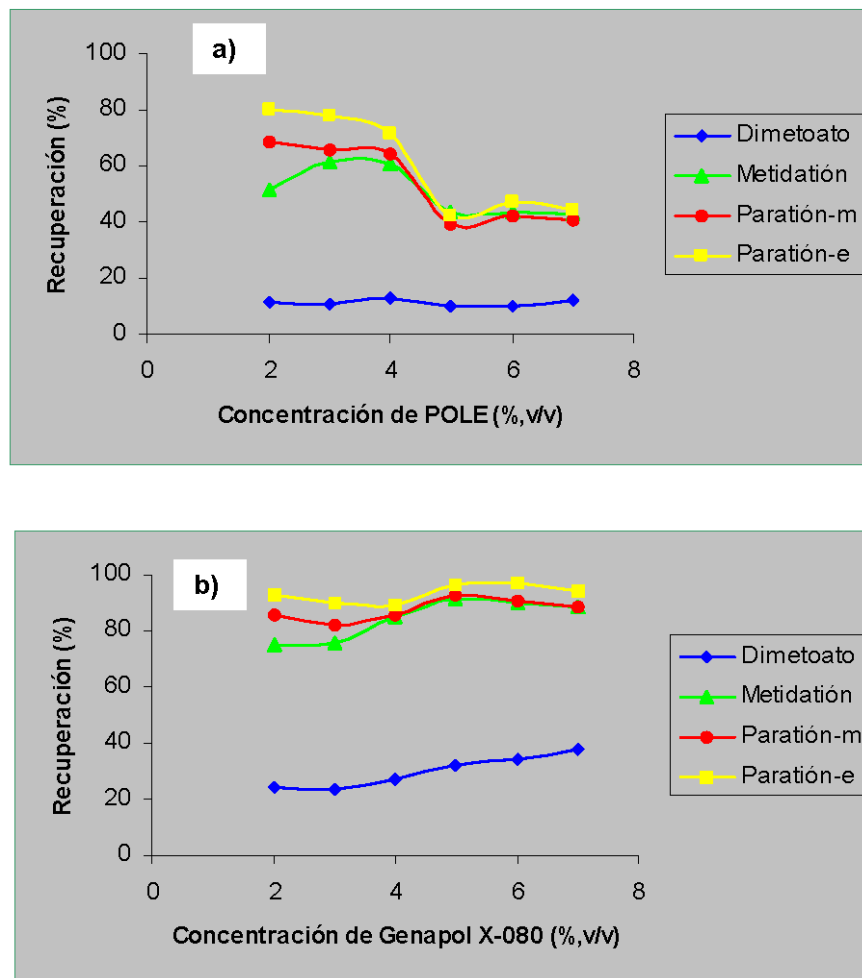
El estudio del efecto de la concentración de surfactante en la extracción se llevó a cabo mediante el análisis de una serie de disoluciones acuosas conteniendo la mezcla de pesticidas organofosforados ( $60\text{-}300\text{ ng.mL}^{-1}$ ), NaCl (5%, *m/v*) y diferentes concentraciones de surfactante desde 2 a 7% (*v/v*) para cada uno de los surfactantes utilizados, POLE y Genapol (X-080). Los resultados mostraron que para el pesticida más polar, el Dimetoato, la extracción no es tan eficiente como para el resto de los pesticidas, obteniéndose recuperaciones por debajo del 30% con ambos surfactantes.

En la Figura II.10a se observa cómo los porcentajes de recuperación con el POLE permanecen prácticamente constantes hasta el 4% (*v/v*) de surfactante, a partir del cual disminuyen de forma drástica hasta estabilizarse de nuevo en torno al 5% (*v/v*). Lo que indica que los pesticidas no se extraen de forma tan eficiente a concentraciones altas de este surfactante.

En el caso del Genapol X-080, Figura II.10b, a pesar de que se produce un pequeño incremento en los porcentajes de recuperación con la concentración de surfactante, dichas recuperaciones se mantienen prácticamente constantes, incluso a altas concentraciones de Genapol X-080. Por lo que se puede considerar que la concentración de este surfactante no afecta en gran medida a la extracción de estos pesticidas en el rango estudiado.

A la vista de estos resultados, y teniendo en cuenta que la concentración de surfactante afecta de forma inversamente proporcional al factor de preconcentración (33) se escogieron las concentraciones más bajas posibles, pero siempre dentro de un rango que permitiese manejar las muestras con relativa facilidad, ya que a concentraciones de surfactante por debajo del 2%, el volumen de fase rica en surfactante es tan pequeño que no puede ser separado ni medido con precisión.

Figura II.10.- Efecto de la concentración de surfactante en la extracción de pesticidas organofosforados de muestras acuosas.



Por lo tanto, se establecieron concentraciones de 3% (v/v) para el POLE y del 2% (v/v) para el Genapol X-080 como las más adecuadas para esta metodología por permitir la mayor preconcentración posible de los analitos a la vez que una mejor manipulación de los extractos. En estas condiciones, los factores de preconcentración que se obtienen son de 17 veces para el POLE y 20 veces para el Genapol X-080.

Por otro lado, se observó que los porcentajes de recuperación aumentan a medida que el compuesto es más apolar, independientemente del surfactante a emplear, y que las recuperaciones fueron, de forma general, notablemente superiores cuando se utiliza Genapol X-080 como extractante en lugar de POLE.

### Efecto de la adición de sal

La adición de sal en este caso está más que justificada para mejorar la eficiencia de extracción de los pesticidas, por el conocido efecto de "salting-out", ya que algunos de los pesticidas organofosforados en estudio son ligeramente apolares.

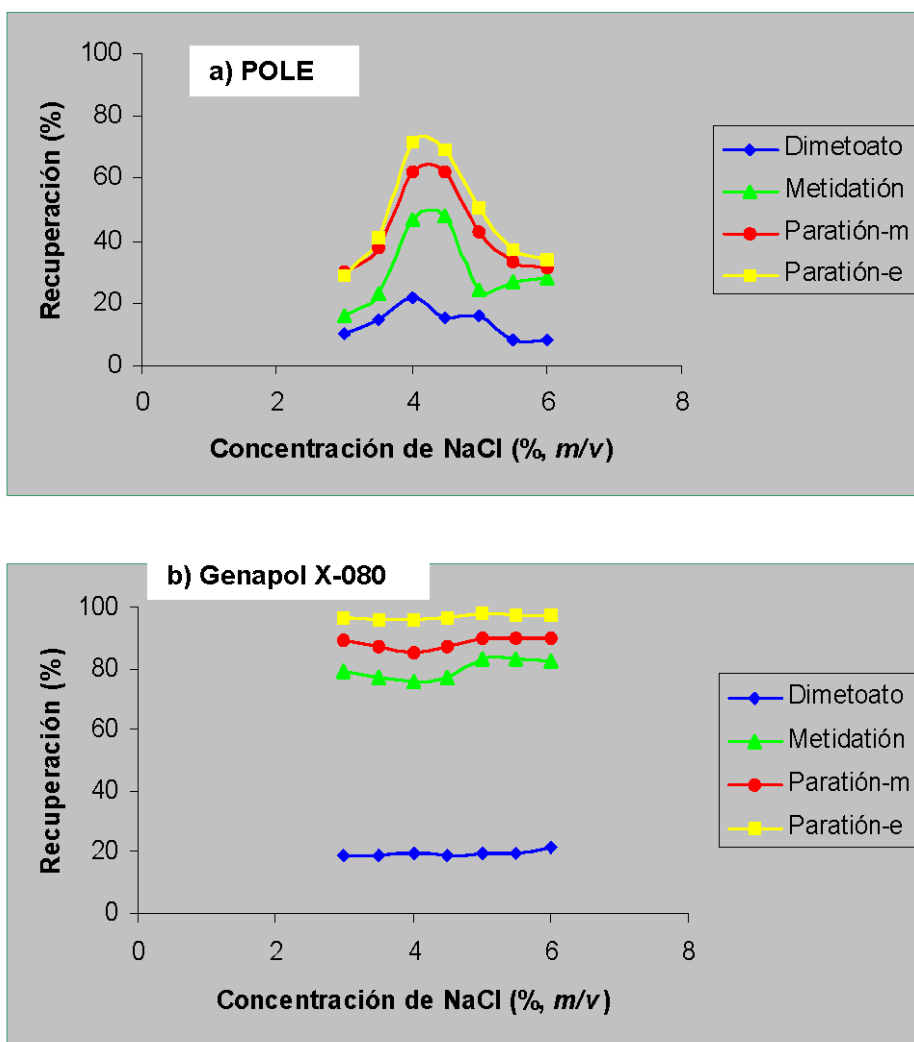
A fin de determinar el efecto de la adición de sal en el proceso de extracción, se analizaron una serie de disoluciones acuosas conteniendo: la mezcla de pesticidas ( $60\text{-}300\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), la concentración de surfactante elegida ( $3\%$  (v/v) y  $2\%$  (v/v) para POLE y Genapol X-080 respectivamente) y diferentes concentraciones de NaCl, entre  $3$  y  $6\%$  (m/v).

En la Figura II.11, se puede observar que cuando se emplea el POLE como extractante, la adición de sal tiene una mayor influencia en la recuperación de los pesticidas, con un máximo de extracción en torno al  $4\%$  (m/v) de NaCl. Sin embargo, cuando se emplea Genapol X-080 los porcentajes de extracción se mantienen prácticamente constantes a lo largo de todo el intervalo de concentración estudiado. En este último caso, y a pesar de que la adición de sal no afecta a la extracción, sí se recomienda su adición, aunque sea en concentraciones pequeñas, ya que favorece la separación de fases y mejora la estabilidad de la capa rica en surfactante (70).

Teniendo en cuenta lo anterior, se decidió añadir porcentajes de NaCl de  $4\%$  (m/v) y  $3\%$  (m/v) para el POLE y Genapol X-080 respectivamente. También

se observó en este estudio que la eficiencia de extracción del Genapol X-080 es mayor, obteniéndose recuperaciones más elevadas que cuando se utiliza POLE como extractante.

Figura II.11.- Efecto de la concentración de NaCl en la extracción de pesticidas organofosforados en muestras acuosas.



### Efecto del tiempo de equilibración

El tiempo de equilibración es el tiempo en el que la muestra está siendo sometida a la temperatura de trabajo, es decir, el tiempo en el que se establece el equilibrio de reparto de analitos entre la fase de surfactante y la fase acuosa. Esta variable puede afectar a la eficiencia de extracción de los pesticidas por efecto de deshidratación de la capa de surfactante y también por la posible volatilización de algunos de los compuestos, ya que, a diferencia de las dioxinas, éstos poseen temperaturas de ebullición mucho más bajas.

El efecto del tiempo de equilibración fue estudiado mediante el análisis de los extractos de una serie de disoluciones acuosas de pesticidas ( $60\text{-}300\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) en las condiciones de concentración de sal y surfactante elegidas en cada caso. Dichas disoluciones se mantuvieron a la temperatura de trabajo ( $20^\circ$  por encima de la temperatura de punto de nube), durante distintos periodos, desde 5 hasta 25 minutos.

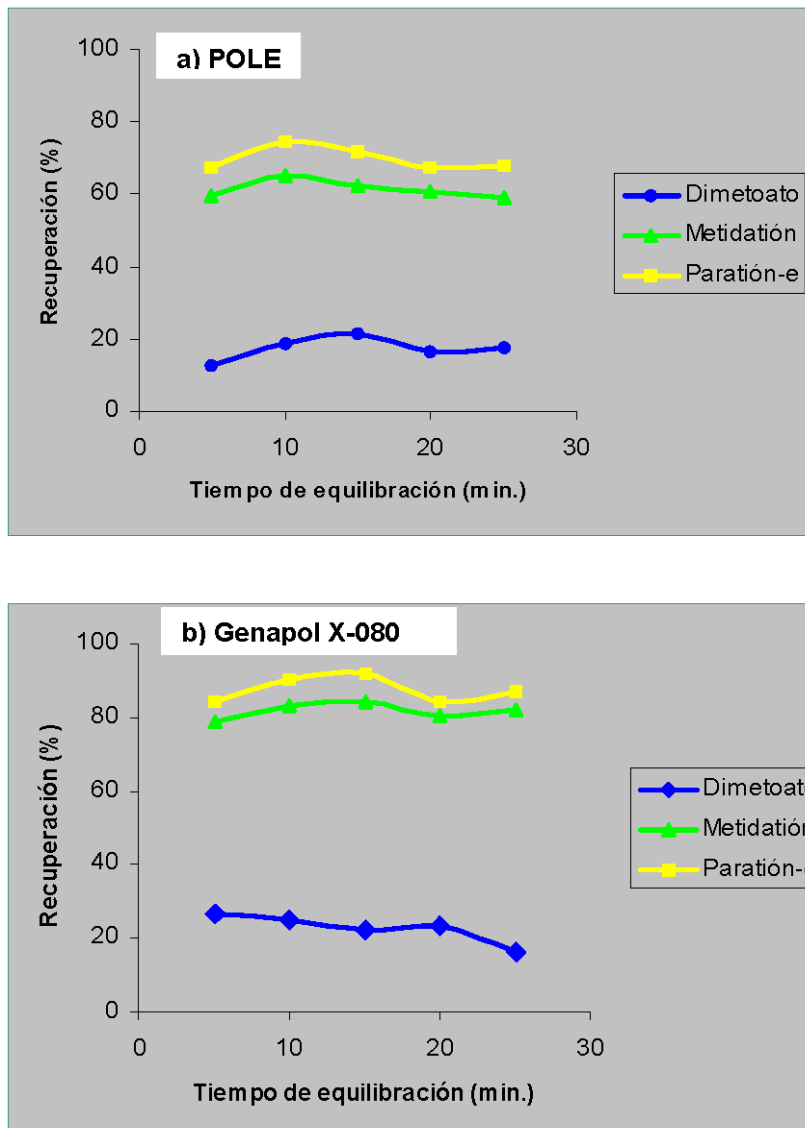
Los resultados, mostrados en la Figura II.12, ponen de manifiesto que esta variable prácticamente no afecta a los porcentajes de recuperación de los analitos con cada surfactante.

#### II.4.2 Parámetros analíticos y Validación del método.

A fin de determinar la reproducibilidad del método, éste se aplicó a la extracción y determinación de seis muestras acondicionadas con la mezcla de pesticidas en estudio. Para ello se aplicó la metodología de punto de nube en las condiciones de extracción más adecuadas cuando se emplea POLE o Genapol X-080 como extractante, y se analizaron los extractos en el sistema HPLC-UV en las condiciones cromatográficas previamente establecidas.



Figura II.12.- Efecto del tiempo de equilibración en la extracción de pesticidas organofosforados en muestras acuosas.



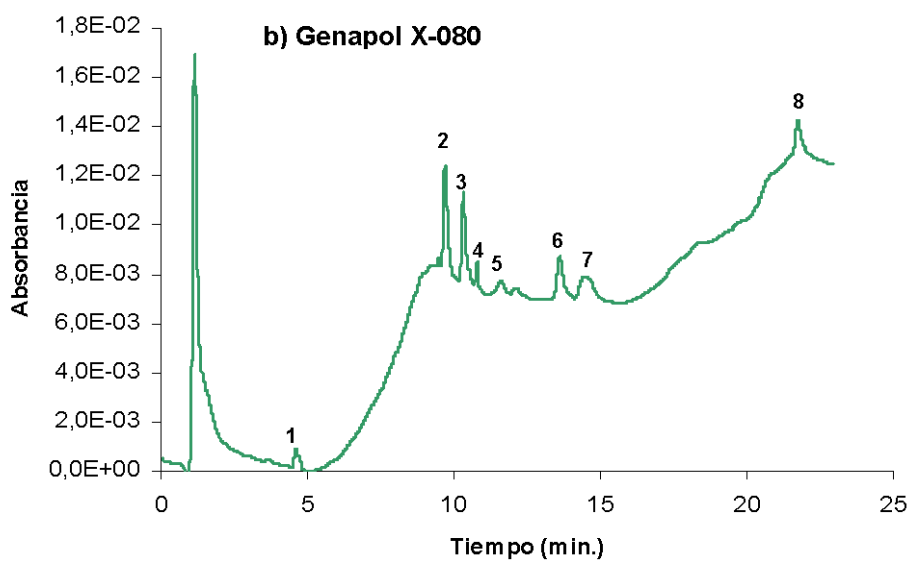
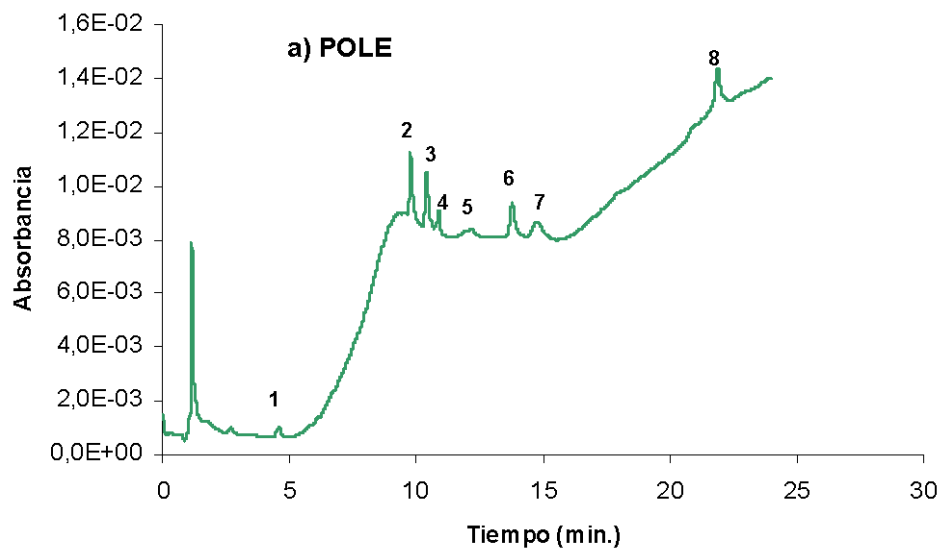
La Figura II.13 muestra los cromatogramas obtenidos de los extractos de la mezcla de pesticidas usando POLE y Genapol X-080 respectivamente. En ellas se observa cómo se obtiene una separación adecuada de todos los pesticidas en estudio. La cuantificación de los mismos se llevó a cabo utilizando las curvas de calibrado recogidas en la Tabla A.7 del Anexo I.

Las desviaciones estándar relativas obtenidas se muestran en la Tabla II.8, donde se observan en todos los casos valores inferiores a 5.5% y 2.6% para el POLE y Genapol X-080 respectivamente. Estos valores son muy similares a los encontrados por otros métodos de extracción/preconcentración como la extracción en fase sólida que hace uso de cartuchos C<sub>18</sub> para la extracción de pesticidas organofosforados en distintas muestras acuosas (17).

También se calcularon los límites de detección para cada analito empleando la relación señal ruido ( $s/n=3$ ) (69) una vez que el método de punto de nube fue aplicado. Los resultados obtenidos se muestran igualmente en la Tabla II.8. Estos valores (sobre todo los obtenidos cuando se emplea Genapol X-080 como extractante) son también muy similares a los encontrados por otros métodos de extracción/preconcentración como la extracción en fase sólida aplicada a la extracción de pesticidas organofosforados de agua potable (19).

Con el objeto de validar la eficiencia de extracción del método, éste fue aplicado al análisis de una muestra acondicionada con una mezcla estándar certificada (Pesticide Mix 1, Dr. Ehrenstorfer), que contiene los pesticidas: Paratión-metil, Paratión-etil, Malatión y Diazinón. La Figura II.14 muestra el cromatograma obtenido para el extracto de esta muestra. Los resultados (Tabla II.9) muestran las recuperaciones obtenidas empleando el método de punto de nube optimizado cuando se emplea Genapol X-080 como extractante, donde se observa que los valores obtenidos son satisfactorios para la mayoría de ellos y muestran la validez del método propuesto.

**Figura II.13.-** Cromatogramas de la mezcla de pesticidas organofosforados en estudio en presencia de los surfactantes POLE y Genapol X-080.



**Tabla II.8.-** Parámetros analíticos del método de extracción *punto de nube* cuando se emplean POLE y Genapol X-080 en la extracción de pesticidas organofosforados en muestras acuosas.

Compuesto	POLE			GENAPOL (X-080)		
	% Rec. <sup>a</sup>	R.S.D. <sup>b</sup> (%)	L.O.D. <sup>c</sup> (ng.ml <sup>-1</sup> )	% Rec. <sup>a</sup>	R.S.D. <sup>b</sup> (%)	L.O.D. <sup>c</sup> (ng.ml <sup>-1</sup> )
Dimetoato	15.2	1.3	1.9 <sup>d</sup>	19.3	0.6	0.6 <sup>e</sup>
Metidati3n	51.1	2.5	1.7 <sup>d</sup>	61.8	0.8	1.4 <sup>e</sup>
Parati3n-metil	60.6	3.2	1.9 <sup>d</sup>	75.9	2.1	0.0 <sup>e</sup>
Malati3n	73.3	0.5	28.5 <sup>d</sup>	64.9	0.7	1.4 <sup>e</sup>
Etoprofos	74.0	5.5	0.9 <sup>d</sup>	55.6	1.4	1.8 <sup>e</sup>
Parati3n-etil	70.3	1.6	2.0 <sup>d</sup>	82.1	2.6	0.4 <sup>e</sup>
Diazin3n	80.1	2.8	3.0 <sup>d</sup>	75.4	1.0	0.5 <sup>e</sup>
Clorpirifos	59.1	2.4	3.6 <sup>d</sup>	99.3	2.2	2.8 <sup>e</sup>

<sup>a</sup> Porcentaje de recuperaci3n.

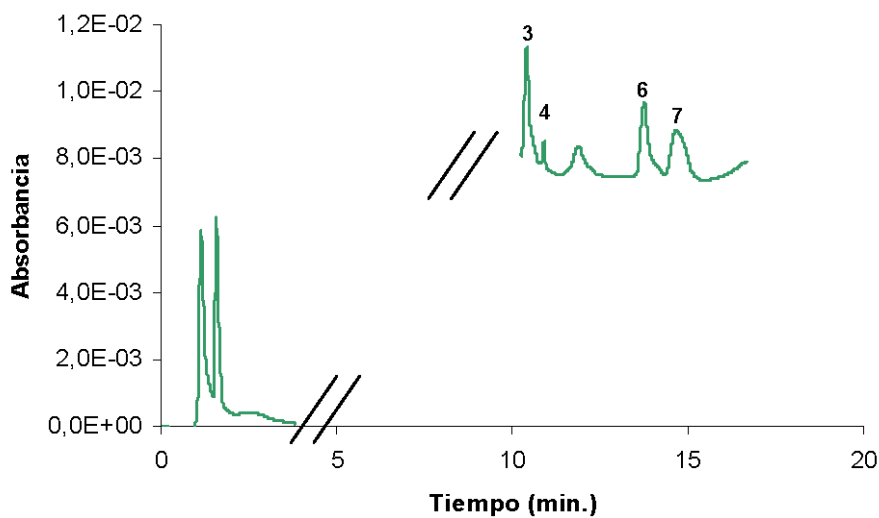
<sup>b</sup> Desviaci3n est3ndar relativa.

<sup>c</sup> L3mite de detecci3n despu3s de aplicar el m3todo *punto de nube*.

<sup>d</sup> Preconcentraci3n de 17 veces.

<sup>e</sup> Preconcentraci3n de 20 veces.

**Figura II.14.-** Extracto de una muestra acuosa conteniendo la mezcla de pesticidas (Pesticide Mix 1, Dr. Ehrenstorfer),



**Tabla II.9-** Recuperaciones obtenidas en la aplicación de la metodología de *punto de nube* empleando Genapol X-080 como extractante en una muestra acondicionada con una mezcla estándar certificada de pesticidas en distintas concentraciones <sup>a</sup>.

	Concentración añadida (ng.mL <sup>-1</sup> )	Concentración Encontrada (ng.mL <sup>-1</sup> )	Rec. <sup>b</sup> (%)	Concentración añadida (ng.mL <sup>-1</sup> )	Concentración Encontrada (ng.mL <sup>-1</sup> )	Rec. <sup>b</sup> (%)
Paratión-m	10	8.2	81.7 ± 2.3	50	35.3	70.6 ± 1.1
Malatión	10	7.5	75.0 ± 0.0	50	30.3	60.6 ± 0.7
Paratión-e	10	8.0	80.4 ± 1.6	50	38.7	77.5 ± 1.9
Diazinón	10	6.3	62.6 ± 3.3	50	32.5	65.0 ± 2.8

<sup>a</sup> Media de tres determinaciones.

<sup>b</sup> Porcentajes de recuperación.

#### II.4.3 Aplicación a otras muestras acuosas

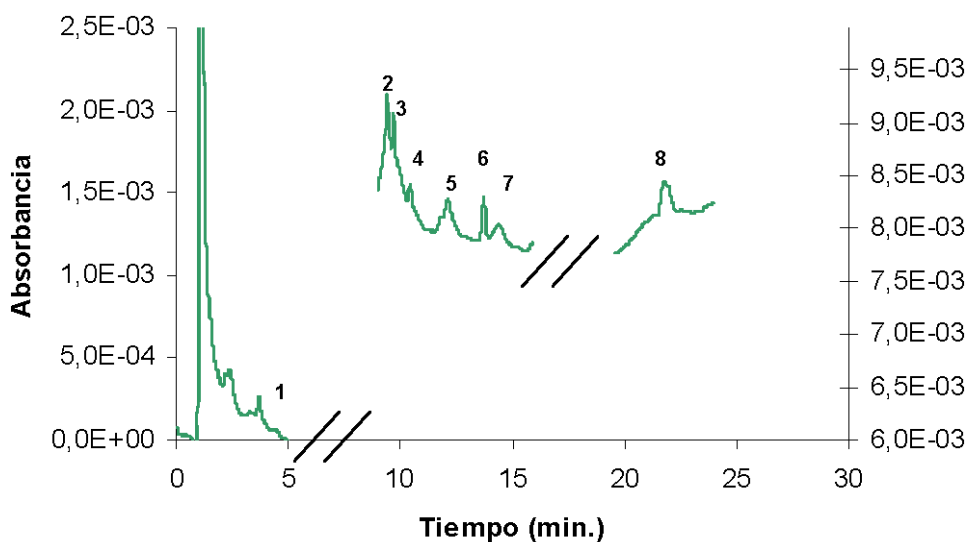
El interés de aplicar el método desarrollado al análisis de pesticidas organofosforados en muestras acuosas de diversa procedencia y tratamiento es evaluar la eficacia y aplicabilidad del mismo. Con este objetivo aplicamos el método desarrollado al análisis de varias muestras acuosas directamente relacionadas con el uso de pesticidas (agua de regadío) y su posible tratamiento (agua residual depurada).

Después de confirmar la ausencia de pesticidas en dichas muestras, éstas fueron acondicionadas con los analitos bajo estudio en un rango de concentraciones variable entre (6-30 ng.mL<sup>-1</sup>) y se les aplicó el método establecido que hace uso del Genapol X-080 como extractante. La Figura II.15 muestra el cromatograma de un extracto de agua de regadío después de la aplicación del método propuesto utilizando Genapol X-080 como extractante.

Los resultados obtenidos para las muestras analizadas se presentan en la Tabla II.10, donde se aprecia que los porcentajes de recuperación son bastante satisfactorios, superiores al 80% para la mayoría de los analitos; sólo

para el Dimetoato y Etoprofos las recuperaciones fueron inferiores al 50%. Estos resultados demuestran que el método propuesto es una alternativa válida para la determinación de estos pesticidas.

**Figura II.15.-** Cromatograma de la aplicación de la metodología CPE a la extracción de una mezcla de pesticidas organofosforados presentes en una muestra de agua de regadío empleando Genapol X-080 como extractante.



**Tabla II.10.-** Recuperaciones obtenidas en la aplicación del método *punto de nube* que emplea Genapol X-080 como extractante a diferentes muestras acuosas acondicionadas con la mezcla de pesticidas en estudio<sup>a</sup>.

Compuesto	Concentración añadida (ng.mL <sup>-1</sup> )	Recuperación (%)	
		Agua Residual Depurada	Agua de Regadío
Dimetoato	10	27 ± 0.5	29 ± 1.5
Metidación	10	86 ± 2.2	85 ± 3.1
Paratión-m	6	92 ± 2.0	83 ± 1.2
Malatión	10	87 ± 1.1	81 ± 0.6
Etoprofos	30	43 ± 1.8	47 ± 2.3
Paratión-e	6	105 ± 1.2	100 ± 1.6
Diazinón	6	89 ± 1.0	84 ± 0.0
Clorpirifos	30	99 ± 3.6	99 ± 5.0

<sup>a</sup> Media de tres determinaciones.

## II.5 BIBLIOGRAFÍA

- 1) Ahmed, F.E. in: Moffat, C.F.; Whittle K.J. (Eds), Chapter 13. (1999) Environmental Contaminants in Food, Sheffield Academic Press.
- 2) Chiron, S.; Fernández Alba, A.; Barceló, D., Environ. Sci. Technol. 27 (1993) 2352.
- 3) Perez, M.; Alario, J.; Vazquez, J. Anal. Chem. 72 (2000) 846.
- 4) Ambrose, D.L.; Fritz, J.S.; Buchmeiser, M.R.; Atzl, N.; Bonn, G.K. J. Chromatogr. A, 786 (1997) 259.
- 5) Czuczwa, J.; Leuenberger, C.; Tremp, J.; Giger W.; Ahel, M. J. Chromatogr., 403 (1987) 233.
- 6) Hennion, M.C.; Cau-Dit-Coumes, C.; Pichon, V., J. Chromatogr. A, 823 (1998) 147.
- 7) Hennion, M.C., J. Chromatogr. A, 856 (1999) 3.
- 8) Rodriguez, I.; Llompарт M.P.; Cela, R. J. Chromatogr. A, 885 (2000) 291.
- 9) Fernandez, M.; Padron, C.; Marconi, L.; Ghini, S.; Colombo, R.; Sabatini, A.G.; Girotti, S. J. Chromatogr. A. 922 (2001) 257.
- 10) Rodriguez-Bencomo, J.J.; Conde, J.E.; Rodriguez-Delgado, M.A.; Garcia-Montelongo, F. Perez-Trujillo, J.P. J. Chromatogr. A. 963 (2002) 213.
- 11) Zhao, L.; Zhu, L.; Lee, H.K. J. Chromatogr. A. 963 (2002) 239.
- 12) Ho, T.S.; Pedersen-Bjergaard, S.; Rasmussen, K.E. J. Chromatogr. A. 963 (2002) 3.
- 13) US Environmental Protection Agency, Method 1613, Washington, DC, 1994.
- 14) Pujadas, E.; Díaz Ferrero, J.; Martí, R.; Broto Puig, F.; Comellas, L.; Rodríguez Larena, M.C. Chemosphere 43 (2001) 449.
- 15) Hashimoto, S.; Matsuda, M.; Wakimoto, T.; Tatsukawa, R. Chemosphere 30 (1995) 1979.
- 16) Rantalainen, A.L.; Cretney, W.J.; Ikonou, M.G. Chemosphere 40 (2000) 147.



- 17) Ballesteros, E.; Parrado, M.J. *J. Chromatogr. A*, 1029 (2004) 267.
- 18) Lopez, F.J.; Beltran, J.; Forcada, M.; Hernandez, F. *J. Chromatogr. A*, 823 (1998) 25.
- 19) Driss, M.R.; Hennion, M.C.; Bouguerra, M.L. *J. Chromatogr.* 639 (1993) 352.
- 20) Sirimanne, S.R.; Patterson, D.G.; Ma, J.L.; Justice, J.B. *J. Chromatogr. B* 716 (1998) 129.
- 21) Sirimanne, S.R.; Barr, J.R.; Patterson, D.G.; Ma, J.L. *Anal. Chem.* 68 (1996) 1556.
- 22) Martinez, R.C.; Gonzalo, E.R.; Jimenez, M.G.G.; Pinto, C.G.; Pavon, J.L.P.; Mendez, J.H. *J. Chromatogr. A* 754 (1996) 85.
- 23) Eiguren Fernández, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodríguez, *Anal. Chim. Acta* 358 (1998) 145.
- 24) Giokas, D.L.; Paleologos, E.K.; Tzouvara-Karayanni, S.M.; Karayannis, M.I. *J. Anal. Atom. Spectrom.* 16 (2001) 521.
- 25) Moreno Cordero, B.; Pérez Pavón, J.L.; García Pinto, C.; Fernández Laespada, M.E. *Talanta* 40 (1993) 1703
- 26) Hinze, W.L. *Annali di Chimica*, 77 (1987) 167.
- 27) Hinze, W.L.; Pramauro, E. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 24 (1993) 133.
- 28) Lindman, B.; Wennerstrom, H. *J. Phys. Chem.* 95 (1991) 6053.
- 29) Corti, M.; DeGiorgio, V.; Hayter, J.B.; Zulanf, M. *Chem. Phys. Lett.* 109 (1984) 579.
- 30) DeGiorgio, V.; Piazza, R.; Corti, M.; Minero, C. *J. Phys. Chem.* 82 (1984) 1025.
- 31) Nilsson, P.; Wennerstrom, H.; Lindman, B. *J. Chem. Phys.*, 87 (1984) 1377.
- 32) Pramauro, E.; Pelizzetti, E. (1996) *Surfactants in Analytical Chemistry Applications of Organized Amphiphilic Media. Volume XXXI, Wilson & Wilson's Comprehensive Analytical Chemistry*, Elsevier, New York, USA.

- 33) Carabias, R.; Rodriguez, E.; Moreno, B.; Perez, J.L.; Garcia, C.; Laespada, E. J. *Chromatogr. A*, 902 (2000) 251.
- 34) Hinze, W.L. (1987) *Ordered Media in Chemical Separations*, W.L. Hinze, D.W. Armstrong, (Eds.) American Chemical Society: Washington DC, USA.
- 35) McIntire, G.L. *Anal. Chem.* 21 (1990) 257.
- 36) Brusdeilins, M.; Zarybnicky, V. J. *Chromatog.*, 287 (1984) 313.
- 37) Zourab, S.M.; Zabet, V.M.; Aboeldahal, H. J. *Dispersion Sci. Tech.*, 12 (1991) 25.
- 38) Marszall, L. *Colloids Surf.* 25 (1987) 279.
- 39) Chobarm, M.M.; Ropot, M.V. *Izv. Akad. Nauk Mold. SSR, Ser. Biol. Khim. Nauk.* 1, 53 (Chem. Abstr., 107, 61031k), (1987).
- 40) Tokiwa, F.; Matsumoto, T. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 48 (1975) 1645.
- 41) Aveyard, R.; Lawless, T.A. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. I.*, 82 (1986) 2951.
- 42) Firman, P.; Haase, D.; Jen, J.; Kalweit, M.; Strey, R. *Langmuir*, 1 (1985) 718.
- 43) Shinoda, K.; Friberg, S. (1986) *Emulsions and Solubilization*, Wiley Interscience, New York, USA.
- 44) Goto, A.; Nihei, M.; Endo, F. *J. Phys. Chem.*, 84 (1980) 2268.
- 45) Donbrow, M.; Azay, E. J. *Colloid Interface Sci.*, 57 (1976) 20.
- 46) Kaneshida, S.; Shibata, O.; Nakamura, M. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 52 (1979) 42.
- 47) Bockelen, A.; Niessner, R. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 346 (1993) 435.
- 48) De Giorgio, V. (1985) *Nonionic Micelles*, in *Physics of Amphiphiles: Micelles, Vesicles and Microemulsions*, V. De Giorgio and M. Corti, Eds., North-Holland, Amsterdam, Netherlands..
- 49) Puvvada, S.; Blankschtein, D. *J. Chem. Phys.*, 92 (1990) 3710.
- 50) Mathis, G.; Leempoel, P.; Ravey, J.C.; Selve, C.; Delpuech, J.J. *J. Anal. Chem. Soc.*, 106 (1984) 6162.

- 51) Puvvada, S.; Blankschtein, D. *J. Chem. Phys.*, 96 (1999) 5579.
- 52) Rupert, L.A.M. *J. Colloid Interface Sci.*, 153 (1989) 92.
- 53) Kato, T.; Seimiya, T. *J. Phys. Chem.*, 90 (1986) 3159.
- 54) Schubert, K.V.; Strey, R.; Kahlweit, M. *J. Colloid Interface Sci.*, 141 (1991) 21.
- 55) Suzuki, T.; Esumi, K.; Meguro, K. *J. Colloid Interface Sci.*, 93 (1983) 205.
- 56) Reatto, L.; Tau, M. *Chem. Phys. Lett.*, 108 (1984) 292.
- 57) Ishikawa, M.; Matsumura, K.I.; Esumi, K.; Meguro, K.; Binana-Limbele, W.; Zana, R. *J. Colloid Interface Sci.*, 151 (1992) 70.
- 58) Nishikido, N. *J. Colloid Interface Sci.*, 136 (1990) 401.
- 59) Frankewich, R.P.; Hinze, W.L. *Anal. Chem.* 66 (1994) 944.
- 60) Saitoh, T.; Hinze, W.L. *Anal. Chem.* 63 (1991) 2520.
- 61) Sirimanne, S.R.; Barr, J.R.; Patterson, D.G. *J. Microcol. Sep.* 11 (1999) 109.
- 62) Standal, S.H.; Blokhus, A.M.; Haavik, J.; Skauge, A.; Barth, T. *Wettability of Solid Surfaces Induced by Adsorption of Polar Organic Components in Crude Oil. Doctoral Thesis. Department of Chemistry, University of Bergen, Norway. 1999.*
- 63) Turner, A.; Rawling, M.C. *Mar. Chem.* 68 (2000) 203.
- 64) Xie, W.H.; Shiu, W.Y.; Mackay, D. *Mar. Environ. Res.* 44 (1998) 429.
- 65) Hinze, W.L. (1992) *Cloud Point Extraction and Preconcentration Procedures for Organic and Related Pollutants of State Concern, Report N° 269; Water Resources Research Institute of the University of North Carolina, Raleigh.*
- 66) Schönfeldt, N. (1969) *Surface Active Ethylene Oxide Adducts. Pergamon Press, New York, USA.*
- 67) Eiguren Fernández, A. *Tesis Doctoral. Departamento de Química, Universidad de Las Palmas de G.C., España. 2000.*
- 68) Birdi, K.S. *Prog. Colloid Polym. Sci.* 70 (1985) 23.

- 69) Lindsay, S. (1992) High Performance Liquid Chromatography, John Wiley and Sons, New York, USA.
- 70) Padrón, C.; Sosa, Z.; Santana, J.J. Anal. Chim. Acta, 470 (2002) 205.

## **CAPÍTULO III.- MATRICES SÓLIDAS**



### III.1 INTRODUCCIÓN

#### *III.1.1 Técnicas de extracción en matrices sólidas*

Para la extracción de contaminantes en muestras sólidas, los métodos tradicionales requieren la utilización de disolventes orgánicos, que permiten la desorción de los compuestos altamente retenidos en la muestra por su fuerte interacción con la matriz. Estos métodos emplean para ello grandes volúmenes de disolventes bajo agresivas condiciones de agitación y/o temperatura.

La técnica de extracción Soxhlet ha sido sin lugar a dudas la más empleada (1, 2). Es una técnica de amplia aplicación, especialmente adecuada para la extracción de contaminantes fuertemente adsorbidos a matrices sólidas (sedimentos, suelos...etc.), sin embargo presenta una serie de inconvenientes ya que es una técnica que normalmente requiere tiempos de extracción muy largos (entre 10-48 h) y la utilización de grandes volúmenes de disolventes orgánicos que, a menudo, presentan toxicidad (3-5).

Otro inconveniente que presenta es que, de esta forma se obtienen extractos altamente diluidos que, posteriormente han de ser concentrados por evaporación, lo que lleva a una posible pérdida de los analitos por volatilización y hace que la atmósfera de trabajo, precisamente por esa evaporación de los disolventes tóxicos, no sea muy conveniente.

En el caso de las dioxinas, el protocolo establecido por la EPA para la obtención y preparación del extracto es especialmente tedioso porque además de la extracción Soxhlet se requieren posteriores etapas de purificación y fraccionamiento de los extractos, lo que a menudo hace inviable el método por la gran cantidad de material (columnas y disolventes) necesarios, el alto coste que ello supone y sobre todo el tiempo a invertir (3).

Otras técnicas que se han desarrollado y empleado tanto para la extracción de dioxinas como pesticidas en muestras sólidas incluyen agitación (shake-flask) (6), sonicación (7, 8), extracción con fluidos supercríticos (SFE) (9, 10), extracción acelerada con disolventes (ASE) (11, 12) y la extracción asistida por microondas (MAE) (13). A continuación se muestra una tabla con algunos ejemplos de aplicación de estas técnicas.

De estas técnicas, vamos a centrar nuestra atención en la extracción asistida por microondas.

Fue en 1975, cuando Abu-Samra y colaboradores (20) emplearon por primera vez los hornos microondas domésticos en el laboratorio para el análisis de trazas de metales en muestras biológicas.

La técnica de extracción asistida por microondas (MAE) consiste en el calentamiento, a través de la energía de microondas, del extractante (un disolvente orgánico en la mayoría de los casos) que está en contacto con la muestra. A diferencia de las técnicas de calentamiento convencionales, permite calentar toda la muestra de forma simultánea sin que lo haga el recipiente que la contiene, por lo que la disolución alcanza su punto de ebullición muy rápidamente permitiendo tiempos de extracción muy cortos (21).



**Tabla III.1.-** Técnicas empleadas en la extracción de dioxinas policloradas y pesticidas organofosforados en matrices sólidas.

Compuesto	Matriz	Técnica	Extractante	Complejidad	Ref.
Dioxinas	Lodos residuales	Soxhlet	tolueno	Muy alta	(14)
Dioxinas	Órganos y huevos de animales	Soxhlet	diclorometano	Muy alta	(15)
Dioxinas	Residuos de incineradoras	ASE	n-hexano acetona (1/1)	Alta	(16)
Pest OP	Frutas y hortalizas	Agitación con disolventes orgánicos	Acetato de etilo	Alta	(17)
Pest OP	Verduras	MAE	2-propanol, ether de petróleo	Media	(18)
Pest OP	Suelos	MAE	Hexano, acetona	Media	(19)

La aplicación de la energía de microondas para la extracción de compuestos de una muestra puede llevarse a cabo mediante dos procedimientos diferentes: con vasos cerrados (Extracción presurizada, PMAE) (controlando la presión y la temperatura) y con vasos abiertos (Extracción focalizada, FMAE) (a presión atmosférica).

En los sistemas de vasos cerrados, el extractante puede ser calentado por encima de su punto de ebullición a presión atmosférica, consiguiendo de esta forma aumentar la velocidad y la eficiencia de la extracción. Estos sistemas permiten el control de la temperatura y presión en el interior de los vasos durante el proceso de extracción. Por otro lado, se puede realizar la extracción

simultánea en varias muestras en una sola etapa, 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 en 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. Estos sistemas funcionan con microondas focalizadas, es decir, las radiaciones son dirigidas a una zona restringida donde la muestra es sometida a un campo eléctrico más fuerte que en el caso anterior, por lo que el calentamiento de la muestra es muy eficiente.

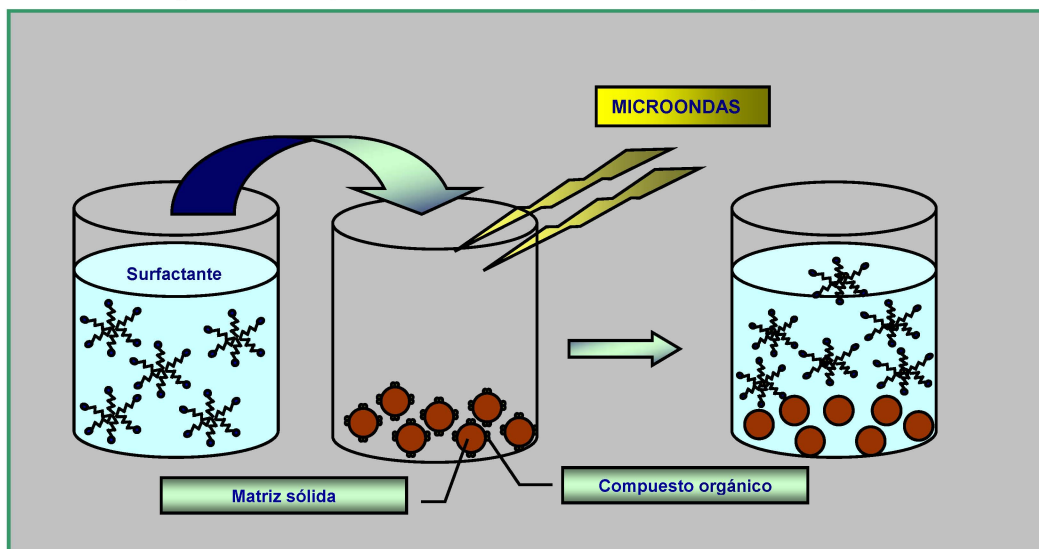
La amplia difusión de estas técnicas basadas en la utilización de las microondas se debe a sus claras ventajas sobre las técnicas más tradicionales, por ejemplo: tiempos de extracción mucho más cortos, requerimiento de una menor cantidad de extractante, una mejor recuperación de elementos y compuestos altamente volátiles, mayor reproducibilidad, niveles de contaminación más bajos y una atmósfera de trabajo más limpia. Por lo que, dichas metodologías han sido adaptadas para numerosas aplicaciones científicas, incluyendo la extracción de pesticidas (22), metales (23), compuestos organoclorados e hidrocarburos aromáticos policíclicos (24), etc. Sin embargo, en la gran mayoría de estas aplicaciones se emplea un disolvente orgánico como extractante.

### *III.1.2 Surfactantes como alternativa (MAME)*

Una alternativa a la aplicación de la técnica MAE, consiste en la utilización de los surfactantes como extractantes, lo que permite adaptar la técnica de extracción asistida por microondas a una nueva forma de trabajo en la que se evite completamente la utilización de disolventes orgánicos. Recientemente se han publicado algunos trabajos (25-27) que demuestran que esta combinación da lugar a una metodología altamente eficiente para la extracción de compuestos orgánicos en muestras sólidas con las ventajas añadidas debidas a los medios micelares: bajo coste, fácil manejo y nulos efectos tóxicos (28, 29). Para referirnos a esta nueva forma de trabajo, se utilizará el término de extracción micelar asistida por microondas (MAME).

La Figura III.1 muestra un esquema del proceso de extracción asistido por microondas utilizando surfactantes. Los surfactantes no iónicos son efectivos en la solubilización y extracción de compuestos orgánicos desde matrices sólidas y además son compatibles con las fases móviles hidroorgánicas usualmente empleadas en cromatografía líquida de alta resolución, que suele usarse como técnica final de determinación.

A fin de obtener el máximo rendimiento de esta metodología, habrá que optimizar los diferentes parámetros que pueden influir en el proceso de extracción, entre los cuales, los más comúnmente estudiados son: la naturaleza del extractante, volumen y concentración del mismo, temperatura de extracción, tiempo y potencia de extracción, y características de la matriz.

**Figura III.1.-** Esquema de la extracción micelar asistida por microondas.

- *Naturaleza del extractante*

Una elección correcta del extractante a emplear es fundamental para una extracción óptima. Para elegir el extractante más adecuado, se debe tener en cuenta que no sólo es preciso que absorba la energía de la radiación microondas (proporcional a la constante dieléctrica del extractante,  $\epsilon'$ ) sino que además, sea capaz de transformarla en calor (proceso dependiente del factor de pérdida dieléctrico,  $\epsilon''$ ). (21)

Por otro lado, hay que tener en cuenta la interacción del extractante con la matriz y la solubilidad del analito en dicho extractante. En este sentido serán preferibles aquellos extractantes que tengan una alta afinidad hacia el analito de forma selectiva, es decir, evitando la extracción de componentes de la matriz no deseados. (30)

Otro aspecto importante es la compatibilidad del extractante con el método analítico a emplear en el análisis final.

Teniendo presente todo lo anterior, los surfactantes no-iónicos pueden ser una alternativa muy interesante ya que al ser esencialmente disoluciones acuosas (concentración de surfactante  $\approx 5\%$ , v/v) son altamente efectivos en la absorción de la energía microondas, debido precisamente al alto momento dipolar de las moléculas de agua. Y además son perfectamente compatibles con las fases móviles empleadas normalmente en Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

- *Concentración y volumen de extractante*

En algunos casos, la concentración y sobre todo el volumen de extractante a utilizar puede ser un parámetro importante en la eficiencia de extracción. Dicho volumen ha de ser el suficiente como para asegurar que la muestra esté completamente inmersa en el extractante, especialmente cuando se tiene una matriz que puede "dilatarse" durante el proceso de extracción. El volumen de extractante necesario para la extracción está comprendido, generalmente, entre 10 y 30 mL. Algunos investigadores han llegado a la conclusión de que la proporción entre la cantidad de muestra y el volumen de extractante no debería exceder de un 30-34 % (m/v) (31).

Generalmente, en las técnicas convencionales de extracción, al aumentar el volumen de extractante se consiguen mejores porcentajes de recuperación, pero en la extracción asistida por microondas no siempre ocurre así. Se ha comprobado en algunos casos que, al aumentar el volumen de extractante, disminuye la eficacia de la extracción, fenómeno que ha sido estudiado por

varios grupos de investigación y que explican puede ser debido a una menor interacción del extractante con la muestra por una agitación deficitaria o menor calentamiento de dicho extractante por parte de las ondas microondas (32-34). En el caso de los surfactantes, también se ha comprobado que aumentos en el volumen de extractante no conducen a mayores eficacias en la extracción, lo que podría ser explicado por la volatilización de los analitos debido a la alta eficiencia de dichas disoluciones acuosas en la transmisión de calor (21).

- *Temperatura de extracción*

El parámetro más importante y decisivo en esta técnica de extracción es sin lugar a dudas la temperatura. Las elevadas temperaturas que se alcanzan bajo este procedimiento resultan en una mejora de la eficiencia de extracción, ya que a estas temperaturas aumenta la difusión del extractante hacia las partes internas de la matriz y se mejora la desorción de los analitos de los centros activos de la misma.

Cuando la extracción por microondas se lleva a cabo en sistemas cerrados, se puede superar la temperatura de ebullición del extractante, lo que produce una mejora en la eficacia de la extracción. Además, al aumentar la temperatura, el extractante tiene mayor capacidad para solubilizar los analitos, y la tensión superficial y la viscosidad del mismo disminuyen, lo que mejora su penetración en la matriz.

En numerosos trabajos, sobre todo en aplicaciones a muestras medioambientales, el uso de altas temperaturas, 100°C o mayores, ofrecen una alta eficacia en la extracción (35-37). Sin embargo, el efecto de la temperatura en la extracción depende también del tipo de analito (38) así como del tipo de

matriz (18). De esta forma, se ha observado que cuando se extraen pesticidas, como las triazinas, de suelos, la temperatura óptima depende de la polaridad del analito así como del tipo de suelo; aunque con temperaturas entre 80 y 100°C se obtienen porcentajes de recuperación aceptables (39).

Los inconvenientes de trabajar a temperaturas tan elevadas incluyen la posible extracción de sustancias no deseadas, por una descomposición excesiva de la muestra, con lo que se pierde selectividad en el procedimiento y la posible degradación de los analitos (30, 40).

En el caso de los surfactantes, al tratarse de disoluciones eminentemente acuosas, es de esperar que la temperatura óptima de extracción esté próxima a los 100°C ya que a partir de esa temperatura se produce la ebullición de los mismos, sin embargo, y como se ha comentado, es un parámetro que dependerá en gran medida de la matriz y de la volatilidad del compuesto a extraer.

- *Tiempo de extracción*

Una de las ventajas que ofrece la extracción asistida por microondas, es precisamente los tiempos de extracción tan cortos que se requieren. Como el calentamiento se produce directamente en el interior de los vasos, este proceso es mucho más rápido y eficiente que en otras técnicas, por lo que los tiempos de extracción a emplear son mucho menores a los necesarios en las técnicas convencionales, en los que pueden llegar a ser superiores a 24 h.

Cuando se hace uso de la extracción asistida por microondas, a menudo 10 minutos son suficientes, como se ha demostrado para la extracción de contaminantes organoclorados en sedimentos (41). En otras ocasiones, también

se ha observado que ciertas muestras y/o extractantes requieren tiempos de extracción muy cortos (30 segundos), aunque en estos casos la eficiencia del método no es tan buena, por lo que se requiere la repetición del proceso de extracción varias veces a fin de mejorar la recuperación de los analitos (42, 43). Sin embargo, lo que se ha comprobado en numerosos casos, es que utilizar tiempos de extracción más largos no conlleva una mejora de la eficacia de la extracción (33, 40, 44). Aunque ello tampoco implica necesariamente la degradación o alteración de los compuestos, excepto en el caso de compuestos termolábiles, como sucede con algunos pesticidas (18).

Por lo tanto, el tiempo de extracción más adecuado será aquel que permita la extracción de todos los analitos de forma más eficaz, en el menor tiempo y el menor número de veces posible. Éste oscilará generalmente entre 5 y 15 minutos en la mayoría de los casos.

- *Potencia de extracción*

La influencia de la potencia cuando se trabaja con vasos abiertos parece ser menor que cuando se emplean vasos cerrados. En estos últimos, a medida que aumenta la potencia aumenta también la presión interna, de manera que la temperatura se eleva mucho antes que si el sistema es de vasos abiertos. Así por ejemplo se ha visto que la variación de este parámetro en un sistema de vasos abiertos, utilizado para la extracción de hidrocarburos aromáticos policíclicos de suelos y sedimentos, no mejoraba la recuperación de los mismos cuando la potencia cambiaba de 30 a 90W (45), así como en el caso de bifenilos policlorados extraídos de lodos (46).



En un sistema de vasos cerrados, en cambio, hay que elegir la potencia de radiación en función del número de vasos utilizados durante el proceso, ya que el calor se repartirá entre todos ellos y algunos sistemas permiten realizar la extracción hasta en 12 muestras simultáneamente. De manera que se elegirá una potencia lo suficientemente alta como para permitir la extracción en un gran número de muestras a la vez, pero que al mismo tiempo evite la degradación de algunos compuestos y una presión demasiado alta en el interior de los vasos.

La influencia de la potencia en la extracción está relacionada con el tiempo de extracción por microondas. Se ha comprobado que en la extracción de hidrocarburos en sedimentos (31), con una potencia de 300 W, el tiempo necesario para obtener porcentajes de recuperación óptimos era de nueve minutos; sin embargo, si la potencia se elevaba a 500-700 W, seis minutos eran suficientes para obtener buenos resultados.

En el caso de los surfactantes, las potencias de trabajo habituales son intermedias, entre 300 W y 600 W (25, 26, 43), ya que al tener esa elevada capacidad de absorción de energía y transformarla en calor no suelen requerir condiciones de radiación muy extremas, aunque en cada caso, dependerá de la matriz y el analito a determinar.

- *Naturaleza de la matriz*

La naturaleza de la matriz en la que se encuentran los analitos de interés tiene una fuerte influencia en la extracción de los mismos, tanto por la composición de la misma como por el tiempo que lleven dichos compuestos en contacto con ella.

Éste efecto fue estudiado por López-Ávila y colaboradores quienes investigaron la eficiencia de extracción de contaminantes orgánicos en cuatro muestras certificadas de sedimentos marinos y dos muestras de suelos. Dichos autores encontraron que, aplicando el mismo procedimiento, la extracción de hidrocarburos aromáticos policíclicos variaba entre 60-100% dependiendo de la naturaleza de la matriz (47).

Es sabido que 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. La mayoría de los contaminantes orgánicos, que suelen ser apolares, interaccionan mucho más fuertemente con aquellas matrices orgánicas complejas (ej.: tejidos de organismos, huevos, animales, etc.) ricas en sustancias liposolubles: grasas, aceites, tejidos adiposos, etc.

Por otro lado, la interacción de los compuestos de interés y la matriz cambia en función del tiempo que éstos permanezcan en contacto. En la mayoría de los casos, se obtienen mayores recuperaciones para muestras enriquecidas que para los contaminantes nativos. Este hecho también explica la disminución de la recuperación de ciertos analitos cuando se extraen de muestras envejecidas. Éste es un fenómeno bien conocido (48-50), que se ha puesto de manifiesto también en otras técnicas de extracción y que puede ser explicado por el tipo de interacción que tiene lugar en el tiempo. Inicialmente, los analitos son incorporados sólo por adsorción superficial, donde la formación de enlaces de hidrógeno y las interacciones por fuerzas de Van der Waals son los procesos predominantes. Posteriormente, los analitos están más fuertemente ligados a la materia orgánica de la matriz debido a mecanismos de transporte por difusión (51). En un estudio realizado por López Ávila y colaboradores (19) sobre muestras enriquecidas, los porcentajes de recuperación de algunos pesticidas organoclorados disminuían desde un 80-120 % hasta un 50-60 % después de 24 horas de contacto.

- *Otros parámetros*

- El pH de la matriz es otro parámetro que puede tener influencia en la extracción. Stout y colaboradores demostraron que la recuperación de herbicidas en suelo aumentaba con el pH, pero que los extractos se hacían a su vez más oscuros debido a la co-extracción de ácidos húmicos (52). Sin embargo, para aquellos analitos sin características ácido-base, el pH del medio no suele ser un parámetro determinante en cuanto a la eficacia de extracción pero sí en cuanto al hecho que pueden extraerse los ácidos húmicos y presentar posibles interferencias en la posterior determinación de los analitos en estudio.

- Cantidad de muestra a analizar: en algunos casos no se ha apreciado que esta variable tenga algún efecto en la recuperación (53) y en otros en cambio, parece que un aumento de la relación *peso de muestra/volumen de extractante*, sí afecta, disminuyendo ligeramente las recuperaciones (54). Al margen de estos resultados, lo cierto es que éste es un parámetro dependiente de la concentración (desconocida) de los analitos que se pretenden analizar y la sensibilidad del sistema de detección final a emplear. En cualquier caso, como ya se ha indicado, debe mantenerse la relación entre la cantidad de muestra y el volumen de extractante (31).

- Número de extracciones a realizar: como se comentó anteriormente, existen algunos estudios en la bibliografía en los que la mejora de la eficiencia del método se consigue con el aumento del número de veces que se repite la extracción. Esto es posible gracias a los tiempos tan cortos que requiere esta técnica (55).

### III.2 EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE DIOXINAS POLICLORADAS

#### *III.2.1 Optimización de la extracción de dioxinas en sedimentos marinos*

El análisis de sedimentos juega un papel muy importante en la evaluación de la contaminación del medioambiente marino ya que sobre este material se acumulan todos aquellos compuestos hidrófobos, como las dioxinas -que son altamente tóxicas-, poniéndose de esta forma disponibles al contacto con los animales y facilitando su entrada en la cadena trófica. Por ello, se plantea la posibilidad de optimizar un método de extracción y análisis rápido, sencillo, eficaz, no contaminante y que sea aplicable a una gran variedad de sedimentos.

La optimización de este procedimiento de extracción se llevó a cabo utilizando un sedimento marino procedente del Puerto de Taliarte (SE, isla de Gran Canaria) con un contenido en materia orgánica superior al de los demás sedimentos empleados en este estudio y con un tamaño de grano inferior a 0.150mm.

#### **Efecto del volumen de extractante**

A fin de determinar si el volumen de extractante a añadir tiene alguna influencia en la eficiencia de extracción de las dioxinas, se hizo un estudio preliminar. Se realizó la extracción en una serie de muestras de sedimento marino enriquecidas con la mezcla de dioxinas bajo estudio, empleando para ello diferentes volúmenes: 5, 10 y 20 mL de una disolución de POLE al (5%, v/v). El análisis cromatográfico de dichos extractos mostró que no existe diferencia alguna entre los mismos, o lo que es lo mismo, que el volumen no afecta a la eficiencia de extracción de las dioxinas. Por lo que se escogió un volumen de 5 mL para los estudios posteriores.

Al mismo tiempo, se midió la temperatura interna de los vasos en los casos mencionados anteriormente, resultando en un promedio de 60°C en todos ellos. En la Tabla III.2 se muestran las temperaturas obtenidas.

**Tabla III.2.-** Efecto del volumen de surfactante en la temperatura alcanzada en el interior de los vasos irradiados a 800W durante 10 minutos.

Volumen añadido (mL)	T <sup>a</sup> interna promedio (°C)	T <sup>a</sup> interna máxima (°C)
5	61	81
10	60	80
20	62	79

### Efecto de la concentración de surfactante

Cuando se emplean surfactantes como extractantes hay que optimizar la concentración más adecuada del mismo ya que, como se vio en el capítulo anterior, la diferente concentración afecta a la forma y tamaño de las micelas, por lo que la interacción de los analitos y el surfactante puede verse afectada por este factor.

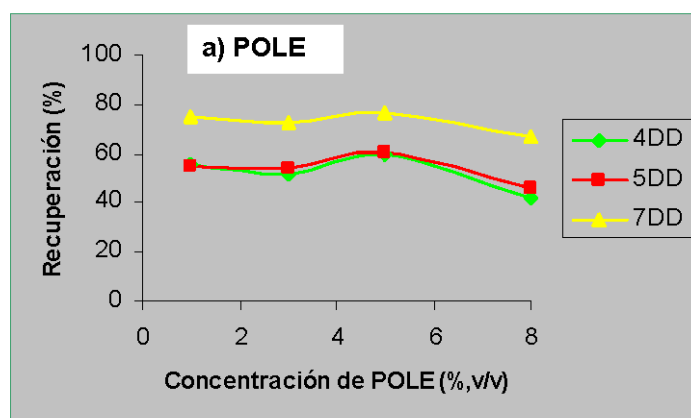
A fin de determinar el efecto de la concentración de surfactante en los porcentajes de recuperación, se analizaron muestras de sedimentos marinos enriquecidos con la mezcla de dioxinas bajo estudio. Para la extracción se emplearon disoluciones de POLE y Genapol X-080 en concentraciones 1, 3, 5 y 8 % (v/v), que fueron sometidas a un calentamiento en el microondas de 200W durante 10 minutos. Este comportamiento puede observarse en la Figura III.2 para algunas de las dioxinas en estudio. Los resultados obtenidos mostraron en

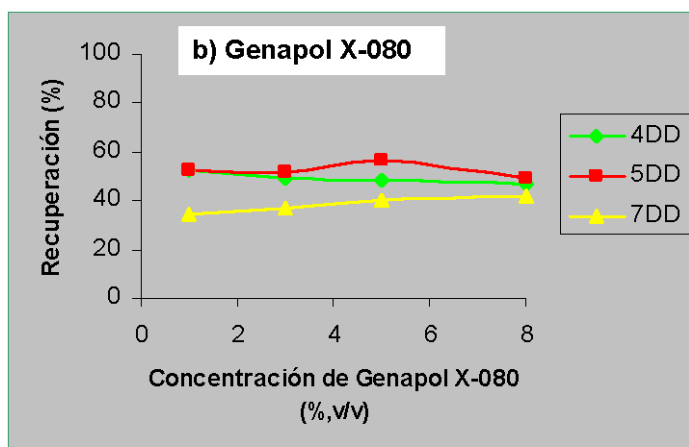
general que la recuperación aumenta ligeramente con la concentración de POLE hasta el 5% (v/v), después del cual se observa un ligero descenso, mientras que para el Genapol X-080, el efecto en la recuperación de las dioxinas es mínimo.

Por otro lado, los porcentajes de extracción obtenidos cuando se emplea POLE son mayores para las dioxinas con un mayor número de sustituyentes de cloro mientras que para el Genapol X-080 la tendencia es la opuesta.

A la vista de los resultados obtenidos se decidió emplear una concentración de surfactante del 5% (v/v) en ambos casos para los subsecuentes estudios.

Figura III.2.- Efecto de la concentración de surfactante en la extracción de dioxinas en muestras sólidas.





### Efecto de la adición de sal

A fin de estudiar el efecto de la adición de sal (NaCl) en los porcentajes de recuperación, se añadieron diferentes cantidades de sal a la disolución de surfactante previamente a su radiación en el microondas. Las muestras enriquecidas con la mezcla de dioxinas en estudio fueron extraídas en el microondas a 200 W durante 10 minutos, empleando disoluciones de POLE y Genapol X-080 al 5% (v/v) y variando la concentración de NaCl de 1 a 8 % (m/v).

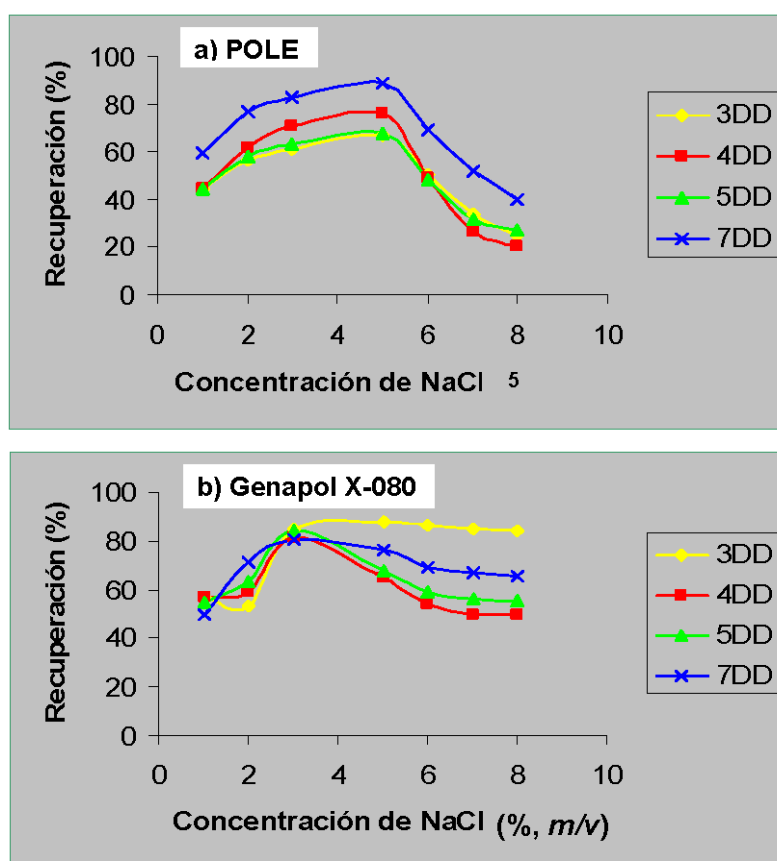
En el caso del POLE, los resultados obtenidos, Figura III.3a, muestran cómo los porcentajes de recuperación aumentan con el aumento en la concentración de sal hasta el 5% (m/v), valor a partir del cual se produce un descenso brusco de los mismos.

En lo que respecta al Genapol X-080, los porcentajes de recuperación aumentan con el incremento en sal hasta el 3% (m/v) de NaCl y posteriormente se estabilizan o bien descienden ligeramente. Los resultados obtenidos para algunas de las dioxinas se encuentran en la Figura III.3b

Por otra parte, también se puede observar que el Genapol X-080 es mejor extractante para aquellas dioxinas con un menor número de sustituyentes de cloro en su estructura molecular.

A la vista de estos resultados, se decidió emplear NaCl en concentraciones de 4% y 3% (*m/v*) para el POLE y Genapol X-080 respectivamente, en los estudios posteriores.

Figura III.3.- Efecto de la concentración de NaCl en la extracción de dioxinas en muestras sólidas.





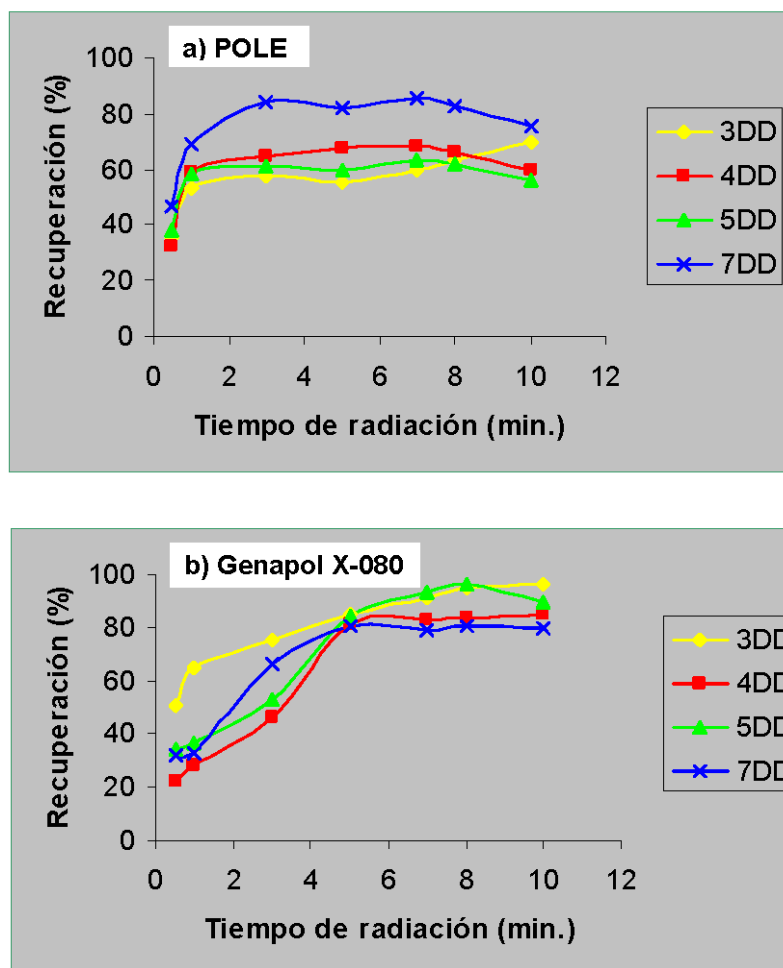
## Efecto del tiempo de radiación microondas

En este estudio, se emplearon diferentes tiempos de radiación, desde 30 segundos a 10 minutos, a una potencia constante de 200 W, para la extracción de una serie de muestras de sedimento marino previamente enriquecidas con la mezcla de dioxinas en estudio. Los resultados obtenidos muestran que cuando se emplea POLE como extractante, la mayoría de los compuestos sufren un incremento rápido en los porcentajes de recuperación durante el primer minuto de radiación microondas a partir del cual se estabilizan (Figura III.4a).

En el caso del Genapol X-080, Figura III.4b, los analitos con un mayor número de átomos de cloro se comportan de modo diferente de manera que su recuperación aumenta de manera gradual durante los primeros 5 minutos y después se estabilizan. Mientras que para los analitos con menor número de átomos de cloro las recuperaciones aumentan más bruscamente durante los 5 primeros minutos para después continuar aumentando ligeramente o estabilizarse.

Por otro lado, se puede apreciar que los porcentajes obtenidos cuando se emplea POLE son menores en la mayoría de los casos que aquellos obtenidos cuando se emplea Genapol X-080. Finalmente, se escogieron tiempos de radiación de 5 y 8 minutos respectivamente, a fin de asegurar la reproducibilidad de las recuperaciones según las condiciones de radiación.

Figura III.4.- Efecto del tiempo de radiación microondas en la extracción de dioxinas en muestras sólidas.



### Efecto de la potencia de radiación microondas

Una vez fueron optimizadas todas las variables a una potencia dada, el último de los estudios a llevar a cabo fue precisamente el correspondiente al efecto de la potencia de radiación en la extracción.

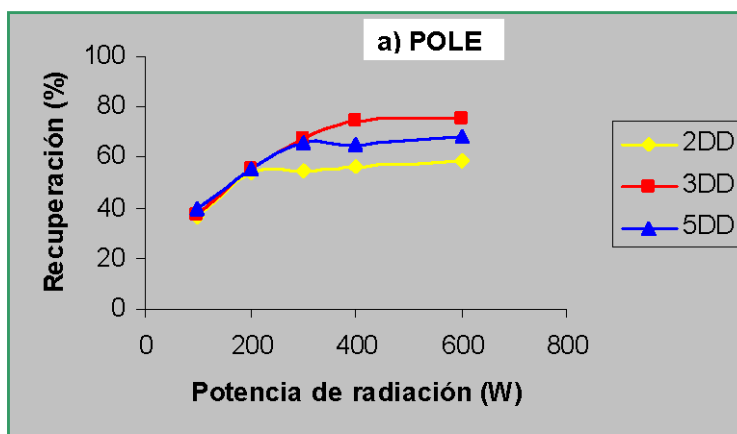
Siguiendo el mismo procedimiento anteriormente descrito para cada surfactante, se realizó la extracción de una nueva serie de muestras enriquecidas a diferentes potencias, variando ésta de 100 a 800 W.

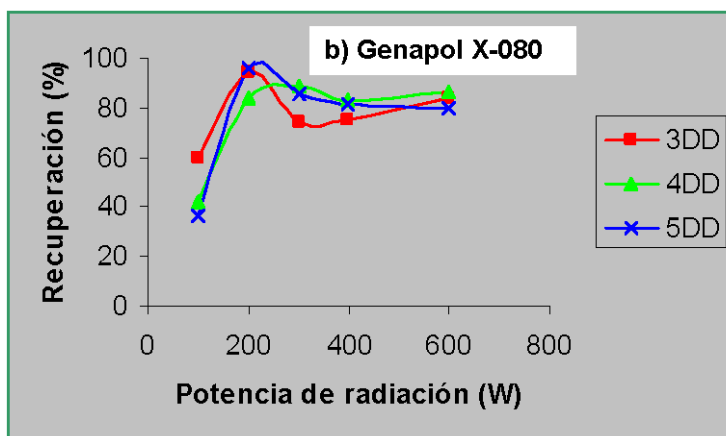
En la Figura III.5 se muestran los resultados obtenidos para algunas de las dioxinas en estudio usando POLE y Genapol X-080 como extractantes, a modo de ejemplo. En ella se observa que hay un incremento en la recuperación con el aumento de la potencia de radiación hasta los 300 W para el POLE, después del cual las recuperaciones permanecen constantes. Para el caso del Genapol X-080 se observa claramente un máximo en los porcentajes de recuperación a 200 W, después del cual desciende ligeramente para estabilizarse posteriormente.

De nuevo en este último estudio, destaca el hecho de que las mejores recuperaciones, bajo las mismas condiciones experimentales, se obtienen cuando se emplea Genapol X-080 como extractante.

Atendiendo a los resultados anteriores, se fijaron potencias de radiación de 300 W y 200 W para el POLE y Genapol X-080 respectivamente.

Figura III.5.- Efecto de la potencia de radiación microondas en la extracción de dioxinas en muestras sólidas.





### Número de extracciones

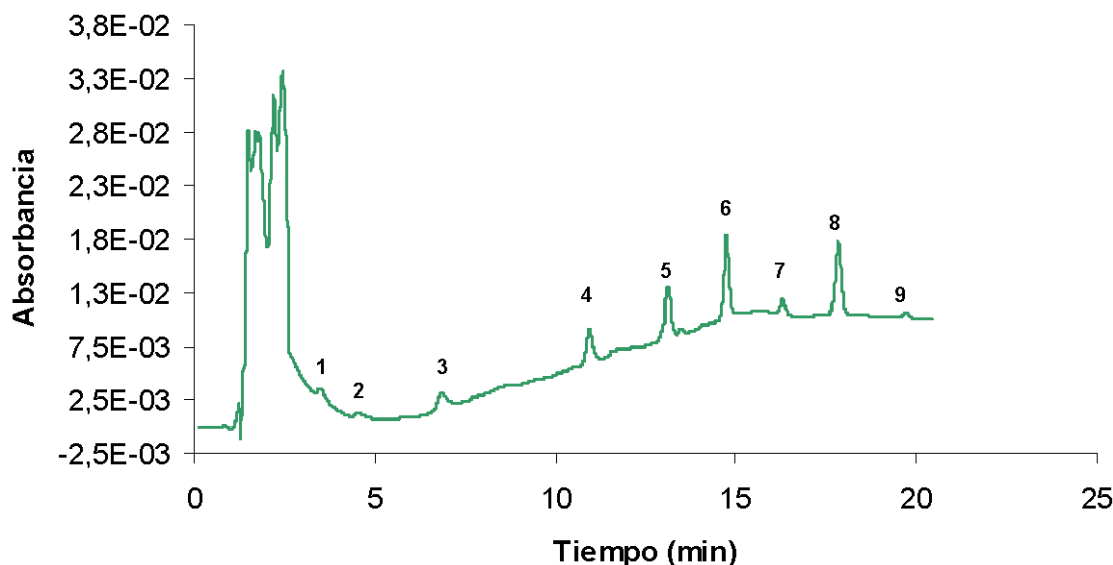
Ya se ha descrito, que en algunos casos se consigue mejorar la eficiencia de la extracción mediante la aplicación varias veces de la metodología optimizada a la misma muestra (43, 56).

En este caso, ya que algunas de las dioxinas en estudio mostraban un porcentaje de recuperación muy bajo (<30%) (sobretudo las más ligeras, DD, 1DD), se realizaron sucesivas extracciones con objeto de mejorar la eficiencia de su recuperación. Sin embargo, a fin de hacer del método un procedimiento de extracción rápido y no laborioso, tampoco conviene realizar un gran número de extracciones. Los resultados mostraron que con dos extracciones sucesivas la eficiencia de extracción mejora considerablemente, obteniéndose recuperaciones entre 60 y 100 % en la mayoría de los casos.

### III.2.2 Parámetros analíticos y Validación del método

A fin de estudiar la reproducibilidad del método propuesto, éste fue aplicado a la extracción de seis muestras de sedimento marino procedente del puerto de Taliarte enriquecidas con la mezcla de dioxinas en estudio. Los extractos fueron analizados en el sistema cromatográfico HPLC-UV en las condiciones previamente establecidas para su determinación. La Figura III.6 muestra el cromatograma obtenido para un extracto de la mezcla de dioxinas utilizando el POLE como extractante. Puede observarse que la separación entre los picos es suficiente para cuantificar adecuadamente todos los analitos.

Figura III.6.- Cromatograma de la mezcla de PCDDs extraída de sedimentos marinos de Taliarte bajo la metodología de extracción MAME empleando POLE como extractante.



Los extractos fueron cuantificados a partir de las curvas de calibrado correspondientes, recogidas en la Tabla A.5 del Anexo I de la presente Tesis

Doctoral. Los valores de desviación estándar relativa obtenidos se muestran en la Tabla III.3 donde se observan valores iguales o inferiores a 2.8 y 4.5% para el POLE y Genapol X-080 respectivamente.

En esta misma tabla se muestran los límites de detección calculados para cada analito en cada surfactante a partir de la relación señal/ruido ( $s/n=3$ ) (57) una vez que el método fue aplicado en las condiciones propuestas para cada surfactante. En el caso del Genapol X-080, estos límites de detección se obtienen después de preconcentrar mediante la metodología de extracción por *punto de nube* al extracto obtenido en el microondas.

Tabla III.3.- Parámetros analíticos obtenidos para los surfactantes POLE y Genapol X-080 como extractantes en la metodología de extracción asistida por microondas.

Compuesto	POLE		Genapol X-080		
	R.S.D. <sup>a</sup> (%)	L.O.D. <sup>b</sup> (ng.g <sup>-1</sup> )	R.S.D. <sup>a</sup> (%)	L.O.D. <sup>b</sup> (ng.g <sup>-1</sup> )	L.O.D. <sup>c</sup> (ng.g <sup>-1</sup> )
DD	2.8	14.7	0.9	27.8	--- <sup>d</sup>
1DD	2.1	30.1	--- <sup>d</sup>	--- <sup>d</sup>	3.2
2DD	2.8	3.9	0.5	11.9	0.9
3DD	2.2	1.0	0.2	9.2	0.7
4DD	2.0	8.5	0.9	10.4	0.8
5DD	2.4	3.2	4.5	7.9	0.6
6DD	1.7	14.8	2.9	43.4	3.3
7DD	0.7	5.1	0.5	1.3	0.1
8DD	2.0	14.5	1.2	6.5	0.5

<sup>a</sup> Desviación Estándar Relativa (n=6).

<sup>b</sup> Límites de Detección.

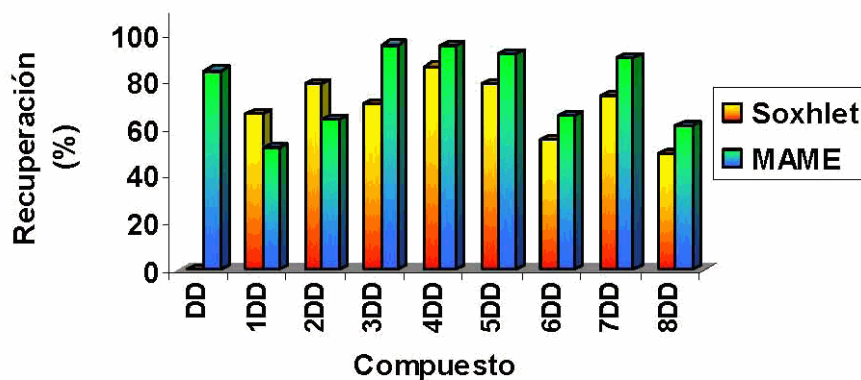
<sup>c</sup> Límites de Detección después de la preconcentración CPE.

<sup>d</sup> Interferencia surfactante.

Con el objeto de validar el método desarrollado, sus resultados fueron comparados con los obtenidos empleando el método de extracción propuesto por la Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos (USEPA) (3, 58) basado en la extracción Soxhlet para el análisis de dibenzo-p-dioxinas en muestras de suelos o sedimentos. Para la cuantificación de los compuestos se utilizaron las curvas de calibrado que se muestran en el Anexo I de la presente Tesis Doctoral, en la Tabla A.5.

En la Figura III.7, se pueden apreciar los valores bastante similares que se obtienen para la recuperación de dioxinas de una muestra de sedimento marino del Puerto de Taliarte de la isla de Gran Canaria cuando se emplea la metodología de extracción asistida por microondas haciendo uso del Genapol X-080 como extractante, y la metodología Soxhlet.

Figura III.7.- Comparación del método MAME y la extracción Soxhlet para un sedimento marino del Puerto de Taliarte (isla de Gran Canaria).



Otro aspecto a destacar en esta comparación, es que la dioxina sin sustituir, no es extraída mediante la metodología de extracción Soxhlet empleada, debido posiblemente a la volatilidad de la misma (el método de la

USEPA es para la extracción de aquellas dioxinas más tóxicas, con más de 4 sustituyentes de cloro), mientras que mediante el procedimiento MAME sí puede ser cuantificada. Como puede observarse, se pone de manifiesto que la extracción asistida por microondas usando medios micelares como extractantes puede ser una alternativa válida frente a los métodos convencionales de extracción.

### *III.2.3 Aplicación a otras muestras sólidas*

Tras optimizar todos los factores de que depende el método de extracción propuesto, el mismo se aplicó a la extracción de dioxinas policloradas presentes en sedimentos marinos de las islas de Gran Canaria y Fuerteventura. Estos sedimentos presentaban una granulometría mayor y un menor contenido en materia orgánica que el sedimento de Taliarte, y un mayor contenido en  $\text{CaCO}_3$  (en el caso de la muestra de Fuerteventura).

El análisis inicial de estas muestras corroboró la ausencia de dioxinas nativas, por lo que, para la aplicación del método sobre las mismas, éstas se enriquecieron con  $100 \text{ ng.g}^{-1}$  de la mezcla de dioxinas en estudio. Posteriormente se realizó la extracción y determinación en las muestras con cada surfactante en las condiciones más adecuadas para cada uno de ellos.

Los resultados obtenidos (Tabla III.4) muestran unos porcentajes de recuperación satisfactorios para ambos tipos de sedimentos. Se puede apreciar, que los resultados son muy similares para cada surfactante cuando se aplica a sedimentos diferentes, mientras que la extracción en un mismo sedimento con surfactantes diferentes sí difiere ligeramente. Es decir, que parece más



influyente en los porcentajes de recuperación la naturaleza de cada surfactante, que las diferencias debidas puramente a la matriz.

**Tabla III.4.-** Porcentajes de recuperación de las dioxinas policloradas en estudio extraídas de sedimentos marinos usando la metodología MAME<sup>a</sup>.

Compuesto	POLE		Genapol X-080	
	Las Canteras (GranCanaria)	Jandía (Fuerteventura)	Las Canteras (GranCanaria)	Jandía (Fuerteventura)
DD	61.8	53.9	89.31	92.6
1-DD	108.5	100.8	— <sup>b</sup>	— <sup>b</sup>
2-DD	106.0	94.7	63.7	69.3
3-DD	61.6	59.7	97.3	90.3
4-DD	80.7	80.8	107.5	102.9
5-DD	83.1	87.7	91.8	102.1
6-DD	74.8	79.9	55.1	69.2
7-DD	75.4	79.7	95.8	109.0
8-DD	78.2	86.4	70.8	94.0

<sup>a</sup> Media de tres determinaciones.

<sup>b</sup> Interferencia del surfactante.

Como se aprecia en la tabla anterior, en general, los resultados obtenidos son mejores cuando se emplea Genapol X-080 como extractante que cuando se emplea POLE, por lo que se propone el primero de ellos como el más adecuado para la extracción de dioxinas de sedimentos marinos.

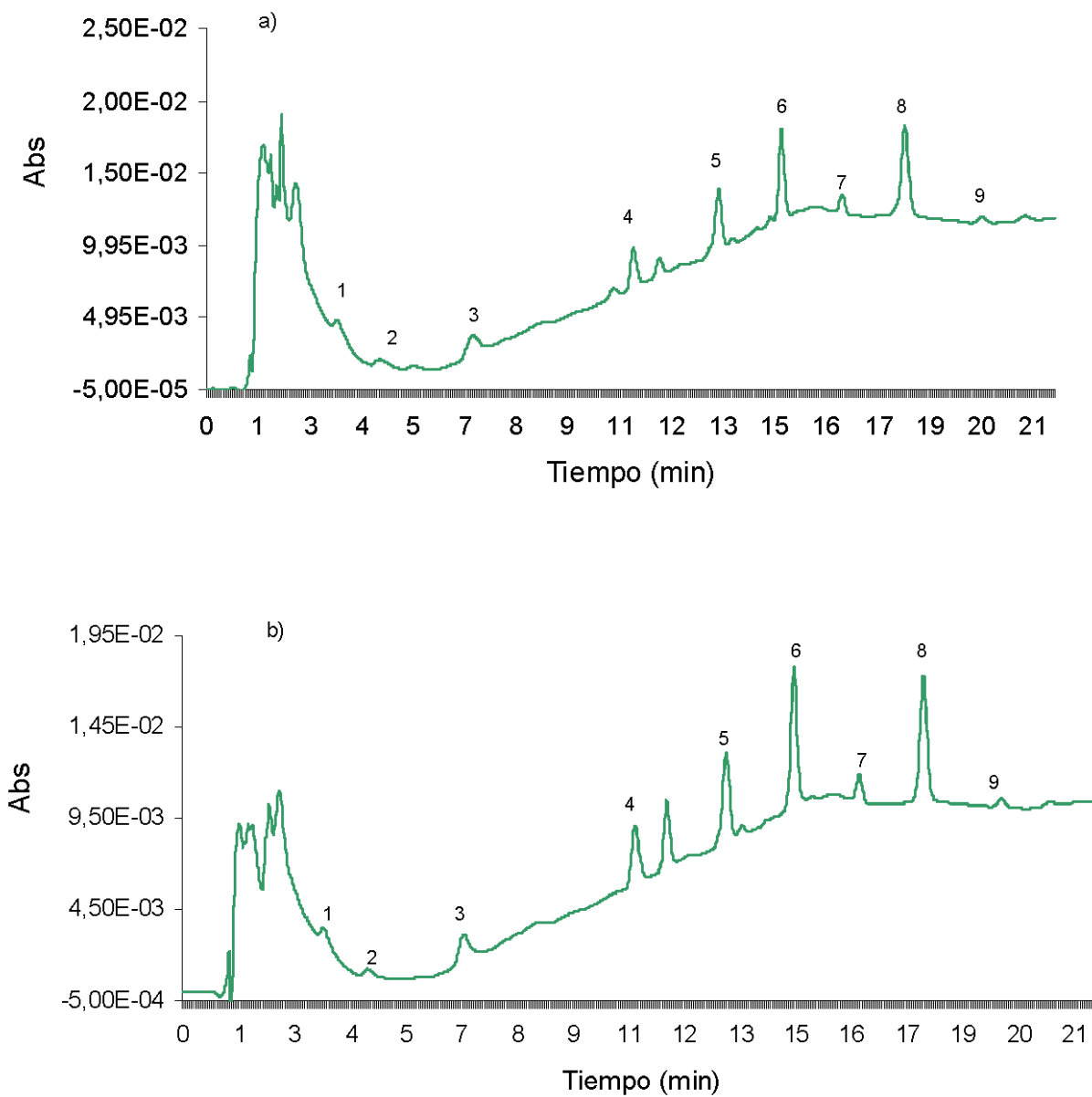
En este sentido, a fin de mejorar los límites de detección de los analitos cuando se extraen con Genapol X-080, se preconcentraron los extractos del mismo mediante la aplicación de la metodología de punto de nube optimizada

previamente antes de su análisis en el sistema HPLC-UV. De esta forma, los extractos obtenidos después del microondas fueron calentados en un baño termostático a 100°C durante 10 minutos.

La fase rica en surfactante obtenida después de este proceso fue analizada directamente en el cromatógrafo. En la Figura III.8 se muestran los cromatogramas obtenidos para los extractos de dioxinas de sedimentos marinos de Gran Canaria y Fuerteventura después de aplicar la metodología MAME-CPE. Los resultados obtenidos revelaron una recuperación satisfactoria para la mayoría de los compuestos en estudio (60-95%). El pico interferente en el tiempo de retención de la dioxina monoclorada que se obtiene cuando se emplea el Genapol X-080 en las condiciones utilizadas en la extracción asistida por microondas, se solventa después de la preconcentración ya que la señal de surfactante se desplaza a tiempos de retención inferiores, por lo que en estas nuevas condiciones ese analito sí puede ser medido.

Bajo estas condiciones, extracción asistida por microondas y preconcentración por punto de nube se obtiene una preconcentración de 12.5 veces lo que redundaría en una mejora considerable de los límites de detección.

**Figura III.8.-** Cromatograma de la mezcla de PCDDs extraída de sedimentos marinos bajo la metodología de extracción MAME y preconcentración CPE haciendo uso del Genapol X-080 como extractante. a) Gran Canaria y b) Fuerteventura



### III.3 EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE PESTICIDAS

Los pesticidas organofosforados son eficaces contra una gran variedad de insectos y se utilizan en cosechas agrícolas, jardines, etc. con objeto de prevenir, destruir o controlar cualquier plaga así como para controlar la presencia de mosquitos portadores de enfermedades. Se encuentran habitualmente en el suelo debido entre otros factores a su aplicación aérea (por fumigación). Éste es un tipo de matriz bastante compleja ya que su composición varía en función del uso que de él se haya hecho, el material a partir del cual ha sido originado, la proximidad o no de vegetación y qué tipo de vegetación, etc. Y esa complejidad hace que su interacción con los analitos de interés sea muy diferente en cada caso. Por lo que además de estudiar y optimizar las variables correspondientes a la metodología de extracción, se tendrán en cuenta algunos parámetros físico-químicos característicos de la matriz y que pueden tener alguna influencia adicional en la eficiencia de extracción de los pesticidas, como es el pH del suelo, su contenido en materia orgánica y su granulometría.

#### *III.3.1.1 Optimización de la extracción de pesticidas organofosforados en suelo*

Para este estudio se utilizó una muestra de suelo procedente de Santa Brígida (isla de Gran Canaria) con las características pH=8.3 y contenido en materia orgánica de 3.4%. Inicialmente seguimos un procedimiento secuencial para optimizar el volumen y concentración de surfactante manteniendo la potencia y el tiempo de extracción constantes. A continuación, se determinaron las condiciones óptimas de potencia y tiempo de extracción.

### Efecto del volumen de surfactante

A fin de determinar si el volumen de extractante a añadir podría influir en la extracción de los analitos debido a posibles pérdidas por evaporación o una incompleta interacción del mismo con la muestra, se hizo un estudio preliminar. Para ello, se midió la recuperación de los pesticidas en estudio después de ser extraídos de muestras de suelo previamente enriquecidas, con 5, 10 y 20 mL de una disolución de Genapol X-080 al (4%, v/v).

Los resultados obtenidos indicaron que volúmenes por debajo de 5 mL no eran suficientes porque no humedecían completamente la muestra, afectando a la reproducibilidad de la extracción; mientras que volúmenes por encima de 10 mL no mostraron influencia alguna en la recuperación de dichos compuestos. De esta forma, se optó por emplear 10 mL en los subsecuentes estudios a fin de asegurar la completa inmersión de la muestra en el surfactante.

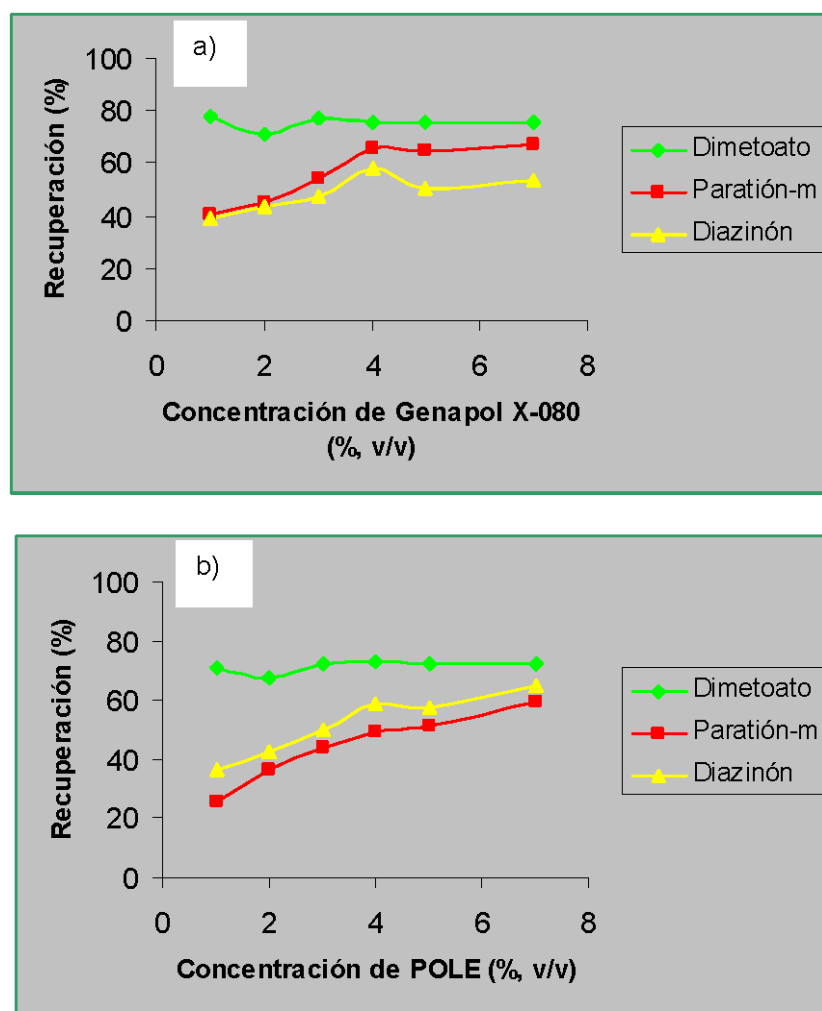
### Efecto de la concentración de surfactante

Para estudiar la influencia de este parámetro en los porcentajes de recuperación, se realizaron diferentes experimentos en los que se llevó a cabo la extracción de la mezcla de pesticidas con los surfactantes POLE y Genapol X-080 en concentraciones de 1, 3, 5 y 7 % (v/v). Las muestras previamente enriquecidas con los pesticidas fueron sometidas a unas condiciones de radiación de 300 W durante 5 minutos.

En la Figura III.9 se muestran los porcentajes de recuperación obtenidos en función de la concentración de surfactante para el Dimetoato, Paratión-metil y Diazinón a modo de ejemplo. Puede observarse cómo el comportamiento es muy similar para ambos surfactantes, en el sentido de que, para los compuestos

más polares como el Dimetoato, la recuperación es prácticamente constante en el rango de concentraciones estudiado, mientras que para los compuestos menos polares, los porcentajes de recuperación aumentan hasta una concentración del 4% (v/v), a partir de la cual se mantienen prácticamente constantes. A partir de estos resultados se decidió utilizar concentraciones del 4% (v/v) para el Genapol X-080 y 5% (v/v) para el POLE en los siguientes estudios.

Figura III.9.- Efecto de la concentración de surfactante en la recuperación de pesticidas organofosforados extraídos en muestras de suelo.



## Efecto del pH

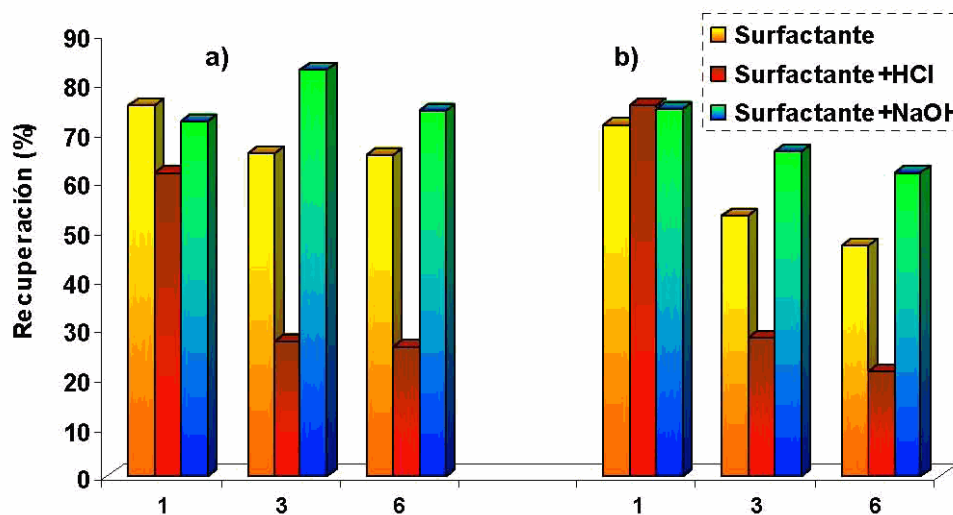
El posible efecto del pH de la disolución extractante en la recuperación de los pesticidas fue determinado mediante el análisis de los extractos de muestras enriquecidas obtenidos con las correspondientes disoluciones de POLE o Genapol X-080 como extractantes a diferentes pH. Éste fue modificado mediante la adición de 0,5 mL bien de HCl (1M) o bien de NaOH (0.1 M) a las disoluciones extractantes en cada caso. Las muestras de suelo fueron irradiadas en el microondas a 300 W durante 5 min y analizadas, después de su filtración, en el sistema cromatográfico.

De forma cualitativa, se observó que los extractos obtenidos eran más oscuros en el caso en que se utilizó NaOH respecto de aquellos en los que se empleó HCl, y más oscuros incluso que aquellos extraídos sólo con surfactante.

El pH de dichos extractos fue muy similar para los surfactantes POLE y Genapol X-080: para los extractos ácidos de 3.3-3.8 y para los básicos de 8.2-8.6 respectivamente. Coincidiendo con la coloración de los extractos y con la diferencia de pH se observó, que los porcentajes de extracción eran en la mayoría de los casos más altos cuando se añadía NaOH (Figura III.10) y más bajos cuando se añadía HCl independientemente del surfactante empleado. Este hecho es coincidente con lo observado por ciertos autores (52), que justifican el aumento de la recuperación de los analitos y el aumento de coloración de los extractos por la co-extracción de ácidos húmicos y fúlvicos de los suelos. Tan sólo para el Dimetoato, no se observan diferencias significativas en las recuperaciones obtenidas en los distintos medios, debido probablemente a la alta polaridad del mismo, por lo que su comportamiento no se ve tan afectado por el cambio de pH en la disolución.

A la vista de los resultados obtenidos se decidió añadir 0.5 mL de NaOH (0.1 M) en los estudios posteriores.

**Figura III.10.-** Efecto del pH en la recuperación de los pesticidas organofosforados en estudio. a) Genapol X-080; b) POLE. Compuestos representados: 1.- Dimetoato, 3.- Paratión-metil, 6.- Paratión-etil.



### Efecto de la potencia y tiempo de radiación microondas

Debido a que la temperatura en el interior de los vasos del microondas es el parámetro que realmente determina la eficiencia de extracción, y depende tanto de la potencia como del tiempo en el que se aplique la radiación, se decidió estudiar ambas variables conjuntamente.

Para ello se siguió un diseño experimental central compuesto a fin de estudiar el efecto de estas dos variables en la extracción, por lo que el diseño es de dos niveles ( $2^2$ ); sin embargo con el objeto de determinar con mayor precisión la influencia de estas variables se amplió el estudio incorporando un diseño



ortogonal en estrella con tres réplicas en el punto central (59). De manera que finalmente se realizaron 11 ensayos en total, en los que las muestras de suelo enriquecidas fueron analizadas empleando diferentes potencias de microondas (mínimo: 200 W; máximo: 800 W) y tiempos de irradiación (mínimo: 2 min.; máximo: 14 min.). En la Tabla III.5 se muestran las condiciones de irradiación empleadas en cada ensayo.

**Tabla III.5.-** Ensayos empleados para el estudio del efecto de las condiciones de radiación en la extracción de los pesticidas organofosforados en estudio.

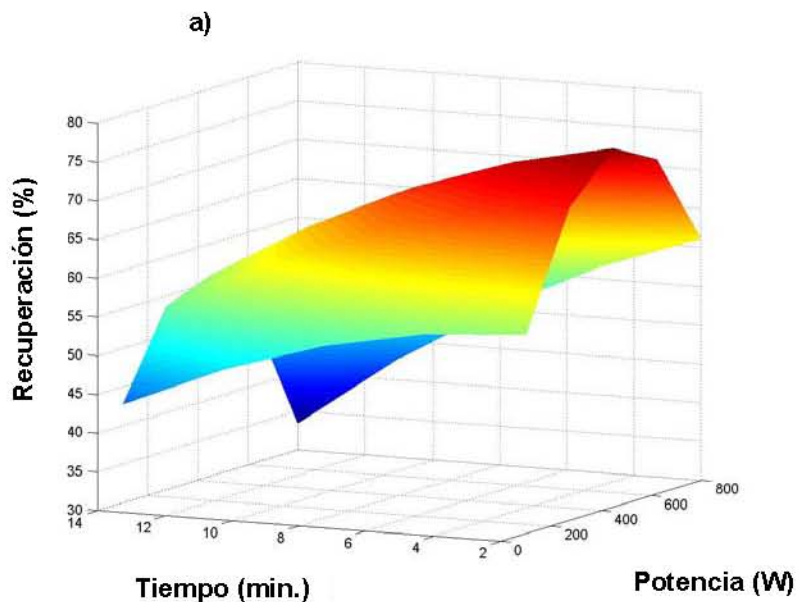
Nº ensayo	Potencia (W)	Tiempo (min)
1	100	2
2	100	8
3	100	14
4	450	2
5	450	8
6	450	8
7	450	8
8	450	14
9	800	2
10	800	8
11	800	14

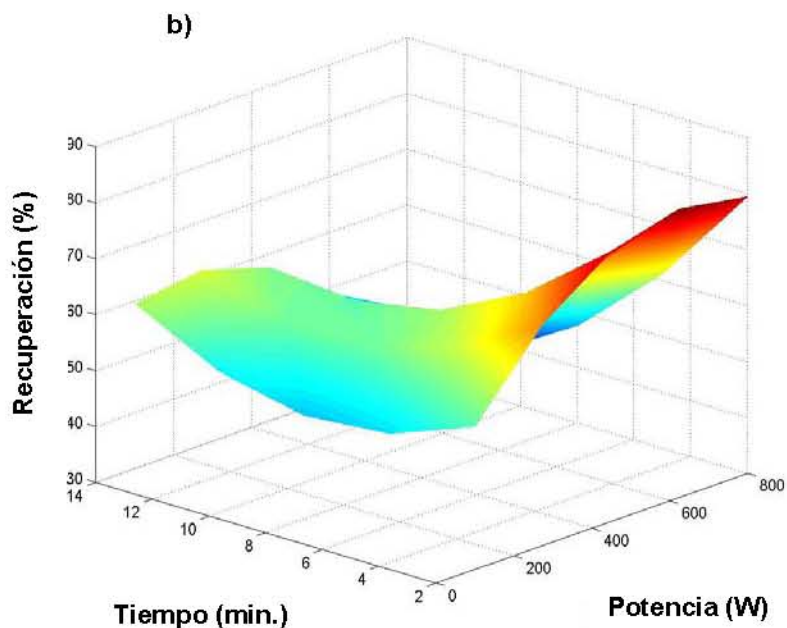
En la Figura III.11a se muestran a modo de ejemplo el resultado obtenido para el Diazinón en Genapol X-080, donde puede observarse un máximo a potencias intermedias y tiempos cortos, comportamiento que fue semejante para los demás pesticidas extraídos con este surfactante. En el caso del POLE, por el contrario, se aprecian unas recuperaciones mayores a potencias más altas y

tiempos cortos. Esto puede ser observado en la Figura III.11b, que muestra el diagrama de superficie para el Paratión-metil.

Pero, a fin de determinar de una forma más precisa los parámetros de tiempo y potencia de microondas óptimos, se calculó, a partir de la ecuación que más se ajustaba al comportamiento de cada pesticida en cada surfactante, el porcentaje de recuperación máximo para cada compuesto en ambos surfactantes. Efectivamente, la media obtenida (a partir del cálculo de los parámetros máximos de cada pesticida) mostró tiempos de radiación de 2 minutos en ambos surfactantes y potencias de radiación de 450 y 625 W para el Genapol X-080 y POLE respectivamente.

**Figura III.11.-** Superficies de respuesta para: a) Diazinón extraído con Genapol X-080 y b) Paratión-metil extraído con POLE.





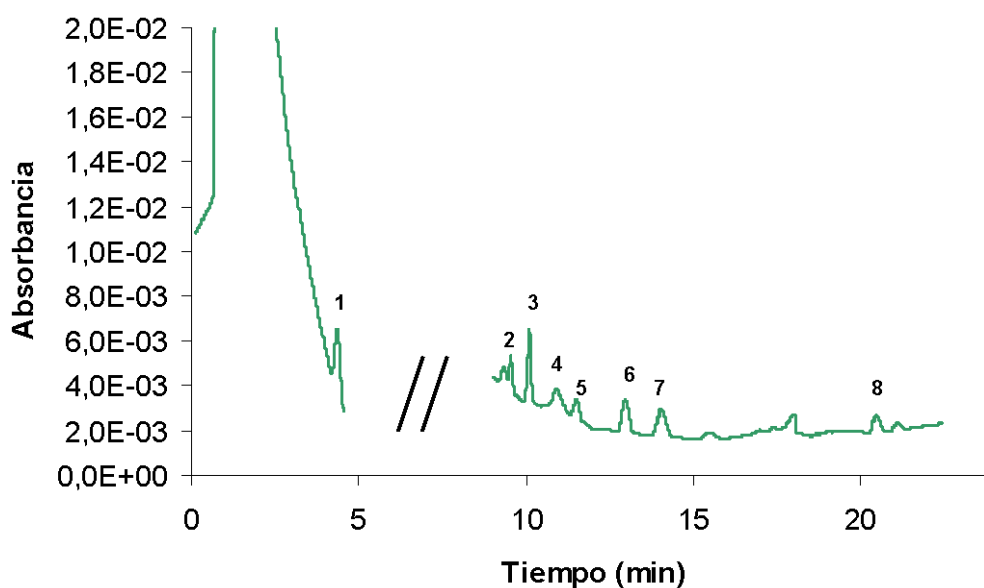
Por último se comprobó que la eficiencia de extracción en las condiciones óptimas de cada surfactante, es en general mejor para la extracción de los pesticidas cuando se emplea POLE que cuando se utiliza Genapol X-080 como extractante.

### III.3.1.2 Parámetros analíticos y Validación del método.

Una vez optimizadas las condiciones para la extracción de los pesticidas en muestras de suelo se estudió la reproducibilidad del método. Éste fue aplicado a seis muestras previamente enriquecidas con la mezcla de pesticidas y los extractos fueron analizados en el sistema HPLC-UV en las condiciones establecidas para su correcta separación e identificación utilizando las curvas de

calibrado obtenidas para los mismos que se encuentran en la Tabla A.7 del Anexo I de la presente Tesis Doctoral. La Figura III.12 muestra el cromatograma obtenido para un extracto de una muestra de suelo procedente de Santa Brígida (isla de Gran Canaria) después de aplicar el método desarrollado, utilizando POLE como extractante. Las desviaciones estándar relativas obtenidas se muestran en la Tabla III.6, en la que se aprecian valores menores o iguales a 2.1 y 2.6 % para el Genapol X-080 y POLE respectivamente.

**Figura III.12.-** Cromatograma de la mezcla de pesticidas organofosforados extraída de una muestra de suelo de Santa Brígida bajo la metodología de extracción MAME empleando POLE como extractante.



Finalmente, se calcularon también los límites de detección de cada analito empleando la relación señal/ruido ( $s/n=3$ ) (57) una vez aplicado el método optimizado. De igual forma, los resultados se muestran en la Tabla III.6, donde puede observarse que en todos los casos los límites de detección son

inferiores a  $7 \text{ ng.g}^{-1}$ , excepto en el caso del Etoprofos y del Malatión. Estos valores de LOD encontrados permiten el análisis de este tipo de compuestos en concentraciones muy por debajo de su LD50 lo que garantiza la posibilidad de ser aplicado en muestras reales de las que se desee saber su grado de contaminación y peligrosidad.

**Tabla III.6.-** Parámetros analíticos del método MAME aplicado a la extracción de pesticidas organofosforados en suelo, con los surfactantes POLE y Genapol X-080.

Compuesto	POLE		GENAPOL X-080	
	R.S.D. <sup>a</sup> (%)	L.O.D. <sup>b</sup> ( $\text{ng.g}^{-1}$ )	R.S.D. <sup>a</sup> (%)	L.O.D. <sup>b</sup> ( $\text{ng.g}^{-1}$ )
Dimetoato	0.4	0.2	1.8	2.4
Metidatión	2.2	4.5	2.1	3.0
Paratión-metil	1.1	2.1	1.2	4.8
Malatión	2.2	14.3	1.1	11.3
Etoprofos	2.6	95.0	1.0	0.8
Paratión-etil	1.6	0.7	1.6	1.8
Diazinón	1.2	2.5	0.8	0.9
Clorpirifos	0.3	6.7	1.1	0.2

<sup>a</sup> Desviación Estándar Relativa.

<sup>b</sup> Límite de detección.

Debido a que el método MAME que hace uso del POLE como extractante proporciona mejores resultados, éste fue aplicado a la extracción de una muestra de suelo previamente enriquecida con una mezcla estándar certificada (Pesticide Mix 1, EPA Method 914) que contiene cuatro de los pesticidas empleados en este estudio (Paratión-metil, Malatión, Paratión-etil y Diazinón), a fin de comprobar la validez del mismo.

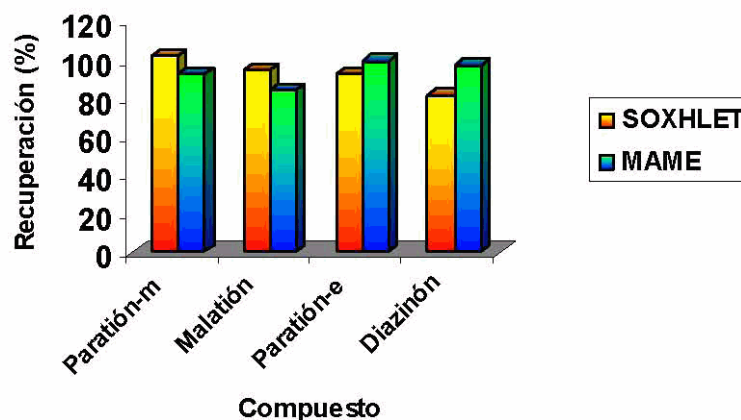
Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla III.7 donde se puede observar la alta eficiencia del método propuesto. Estos resultados fueron comparados con los obtenidos al emplear la técnica de extracción tradicional Soxhlet propuesta por la Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos para este tipo de compuestos (60) encontrando una gran concordancia en los mismos como se muestra a continuación en la Figura III.13. Por lo que se puede aceptar que el método de extracción asistido por microondas que hace uso de los surfactantes como extractantes es una alternativa válida a los métodos de extracción convencionales.

**Tabla III.7.-** Aplicación del procedimiento MAME propuesto a la extracción de una muestra de suelo previamente enriquecida con una mezcla estándar certificada de pesticidas organofosforados<sup>a</sup> (Pesticide Mix 1, EPA Method 914).

Compuesto	M A M E		
	Añadido ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Encontrado ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Recuperación (%)
Paratión-m	1.50	1.39 $\pm$ 0.02	92.7
Malatión	1.50	1.27 $\pm$ 0.04	84.7
Paratión-e	1.50	1.49 $\pm$ 0.12	99.3
Diazinón	1.50	1.46 $\pm$ 0.02	97.3

<sup>a</sup> Media de tres determinaciones.

**Figura III.13.-** Comparación del procedimiento MAME propuesto y la técnica tradicional Soxhlet en la extracción de una muestra de suelo previamente enriquecida con una mezcla estándar certificada de pesticidas organofosforados<sup>a</sup> (Pesticide Mix 1, EPA Method 914).



### III.3.1.3 Aplicación a otras muestras sólidas

A fin de estudiar la versatilidad del método de extracción micelar asistida por microondas que hace uso de los surfactantes POLE y Genapol X-080, éste fue aplicado a la extracción de los pesticidas en estudio, en suelos con diferentes características físico-químicas (pH, contenido en materia orgánica y granulometría) previamente enriquecidos. Los valores de dichas características se encuentran recogidos en la Tabla III.8.

Tabla III.8.- Parámetros físico-químicos de las muestras de suelo estudiadas.

	pH	M.O. (%) <sup>a</sup>	Granulometría (%)			
			250 $\mu\text{m}$	125 $\mu\text{m}$	0.0625 $\mu\text{m}$	< 0.0625 $\mu\text{m}$
Suelo n° 1	8.3	3.4	69.9	16.9	6.9	5.8
Suelo n° 2	5.9	3.9	56.5	30.6	6.8	6.0
Suelo n° 3	8.3	12.5	45.8	32.1	12.0	10.1

<sup>a</sup> Contenido en materia orgánica.

En primer lugar se comprobó la ausencia inicial de dichos compuestos en las muestras estudiadas.

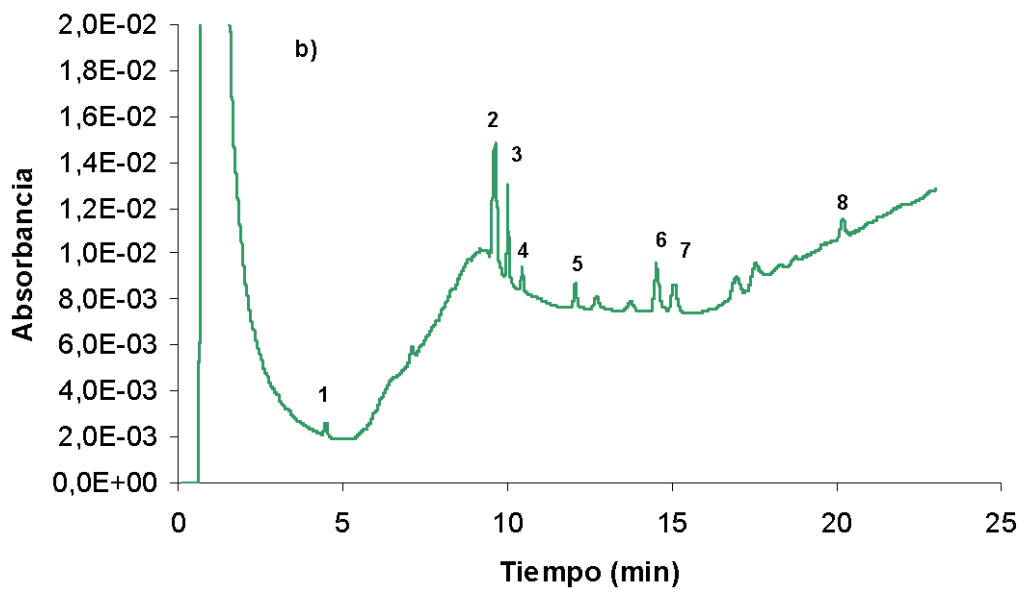
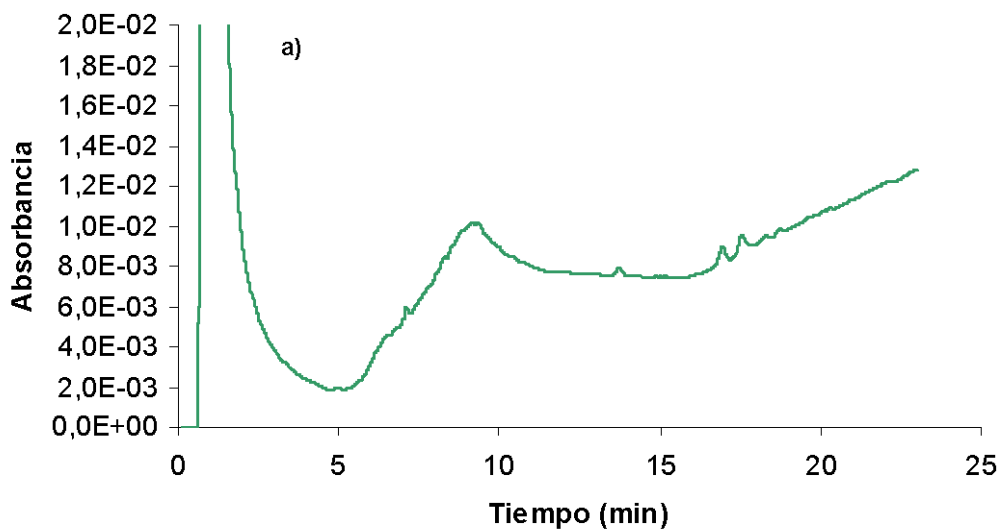
Posteriormente se enriquecieron con la mezcla de pesticidas organofosforados con concentraciones comprendidas entre 0.5 y 2  $\mu\text{g.g}^{-1}$ , y se analizaron en las condiciones más adecuadas para cada surfactante.

En la Figura III.14 se muestran los cromatogramas de los extractos de muestras del suelo n°2 sin acondicionar y acondicionado con la mezcla de pesticidas.

Los resultados obtenidos para el análisis de las diferentes muestras se presentan en la Figura III.15, donde se puede apreciar cómo en general, la eficiencia de extracción es mejor cuando se emplea el POLE, con porcentajes de recuperación más altos, sobretodo en las muestras n° 1 y n° 3 que son aquellas que presentan un pH básico. Sin embargo, en el caso de la muestra n° 2 (de pH ácido) parece que es el Genapol X-080 el surfactante que extrae con mayor eficiencia los compuestos más polares.

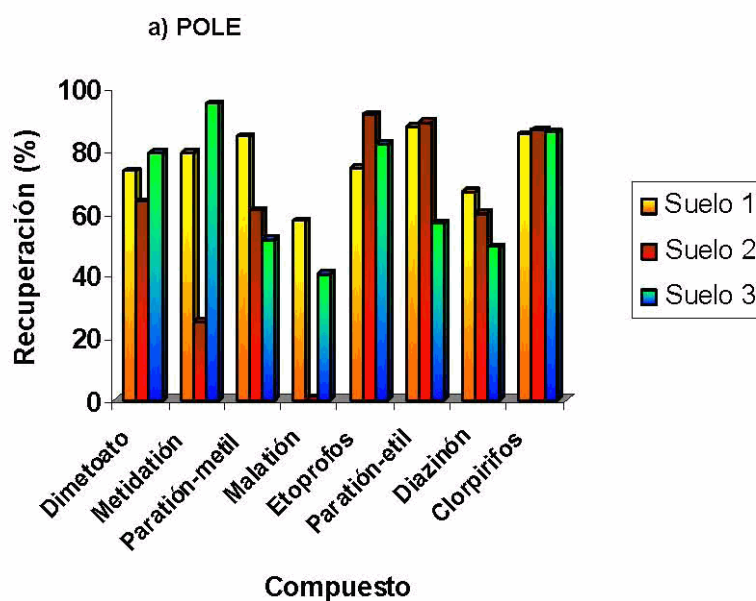


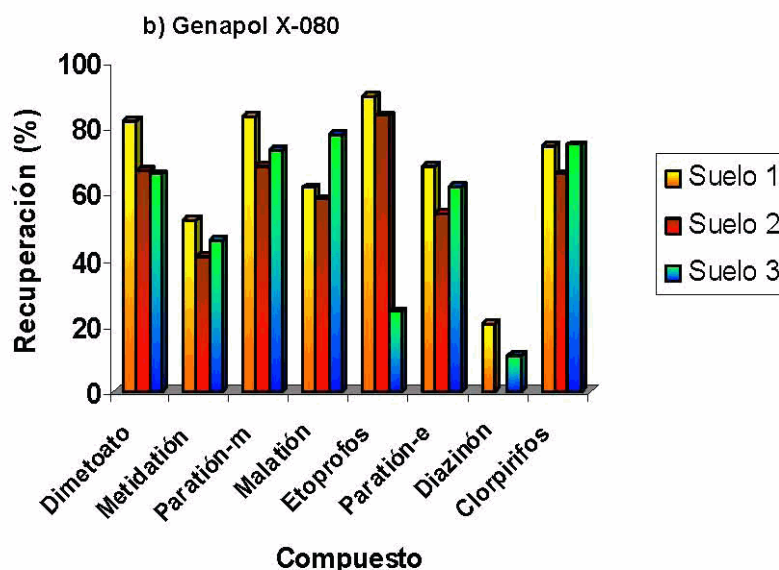
Figura III.14.- Cromatogramas de los extractos de la muestra del suelo nº 2 bajo la metodología de extracción MAME empleando Genapol X-080 como extractante. a) muestra sin acondicionar, b) muestra acondicionada con la mezcla de pesticidas organofosforados.



De forma más detallada, se puede observar que algunos de los compuestos siguen un mismo patrón de comportamiento en todas las muestras, así por ejemplo el Diazinón y Clorpirifos se extraen mejor con POLE y el Malatión mejor con el Genapol X-080, independientemente de las características del suelo. Sin embargo, para el resto de los compuestos la extracción sí parece depender de ambas variables y del surfactante a emplear, teniendo en cuenta las grandes variaciones observadas en los porcentajes de recuperación.

Figura III.15.- Aplicación de la metodología MAME optimizada a muestras de suelos con diferentes características.





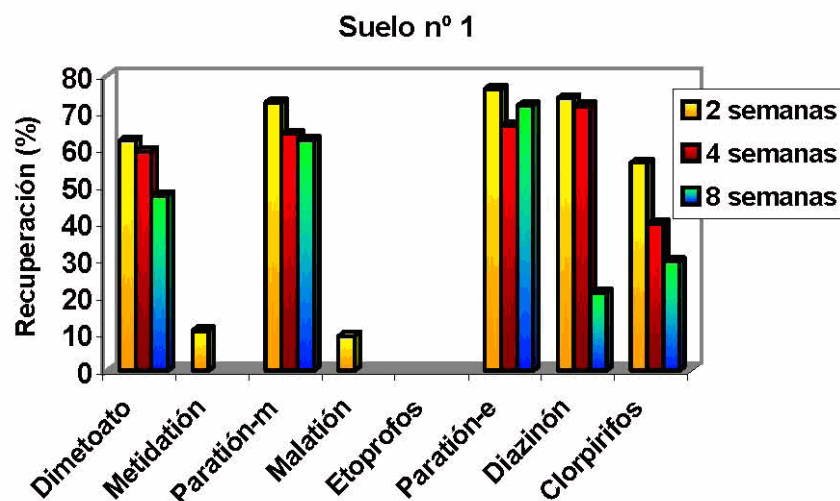
La influencia del envejecimiento de la muestra sobre los porcentajes de recuperación de los analitos es un fenómeno conocido (61). Con objeto de comprobar este efecto, se aplicó el procedimiento MAME optimizado usando POLE como extractante a muestras de suelo envejecidas a diferentes tiempos: 2, 4 y 8 semanas. En la Figura III.16, donde se recogen los resultados obtenidos para las muestras de suelo nº 1, 2 y 3, a diferentes tiempos de envejecimiento, puede observarse que a medida que avanza el tiempo de contacto entre el analito y la matriz, disminuye, en general la recuperación de todos los analitos bajo estudio, lo que puede explicarse por una mayor interacción entre ambos (51). Este efecto, también podría ser debido a un proceso de degradación puesto que, como es bien sabido, la degradabilidad de esta familia de compuestos es mucho mayor que la de los pesticidas organoclorados.

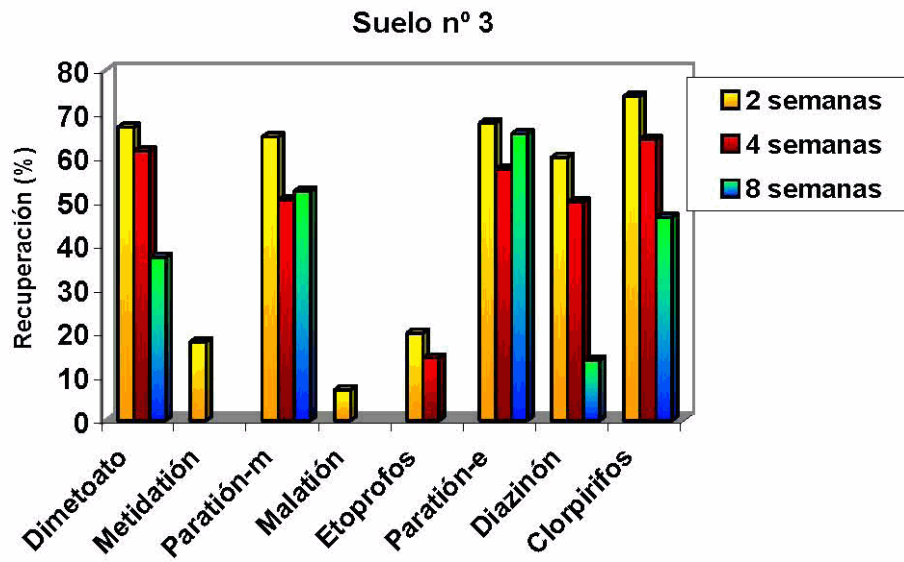
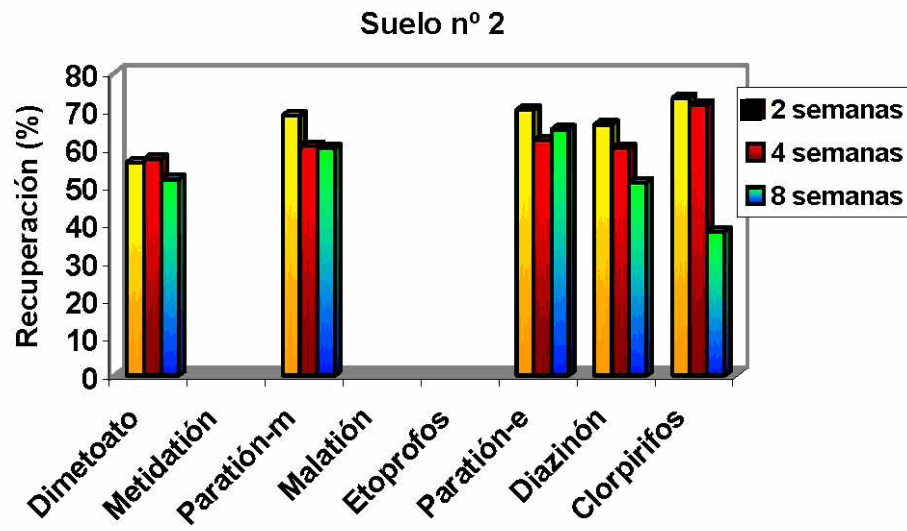
Desde un punto de vista comparativo, no se aprecian diferencias significativas en las recuperaciones de los compuestos extraídos de las distintas tierras sino que el efecto del envejecimiento afecta por igual a la recuperación de todos los analitos en el tiempo.

Entre las diferentes rutas de descomposición de los pesticidas organofosforados (hidrólisis, oxidación fotolítica, transformaciones microbianas, etc.) (62, 63), la hidrólisis es el proceso de degradación más común, el cual suele tener lugar en los centros activos de una molécula de pesticida dada (64). En este sentido se observa claramente que los compuestos Metidatión, Malatión y Etoprofos prácticamente dejan de extraerse desde las dos semanas, lo que podría explicarse por diferentes mecanismos de degradación incluidos la presencia de ácidos húmicos, óxidos de metal y la estructura del suelo (63-66). Además, en el suelo nº 2, que es de pH más bajo, la desaparición de estos compuestos es aún más evidente, lo que podría confirmar el proceso de hidrólisis de los mismos.

Sin embargo, esta tendencia no es igual para todos los compuestos en estudio, puesto que la recuperación de Paratión-metil y Paratión-etil se mantiene aproximadamente constante a partir de las cuatro semanas, lo que podría interpretarse como que estos compuestos son los más persistentes.

Figura III.16.- Recuperaciones de la mezcla de pesticidas organofosforados de muestras envejecidas después de aplicar el método MAME con POLE como extractante.





### III.3.2.1 Optimización de la extracción de pesticidas organofosforados en tomates

Los pesticidas organofosforados son ampliamente utilizados en la agricultura debido a sus características insecticidas muy potentes y su utilización está permitida por ley, no sin cierta regulación. Concretamente en la Isla de Gran Canaria, donde predomina el cultivo del plátano y el tomate, el uso de estos pesticidas es imprescindible para evitar ciertas enfermedades y plagas. Sin embargo, la Unión Europea establece que los “Niveles Máximos” (Maximum Residue Levels, M.R.L.) de algunos de los pesticidas organofosforados que pueden contener las frutas y verduras que se exportan y comercializan deben estar entre 0.3 y 1 mg.Kg<sup>-1</sup> (67).

Esta regulación es debida al peligro potencial que suponen al hombre, quien es el último consumidor. En este sentido, el mayor peligro se presenta cuando los productos se consumen frescos sin otro tratamiento que ser lavados, como es el caso de los tomates, que se suelen consumir con piel, en la cual se concentran principalmente los pesticidas (68).

Por todo ello, se propuso como objetivo la optimización y desarrollo de una metodología para la extracción y análisis de pesticidas en piel de tomate.

A partir de los resultados obtenidos en el estudio anterior correspondiente a la extracción de pesticidas en suelos, se decidió emplear la misma concentración y volumen de surfactante optimizados en este nuevo caso, ya que estas variables dependen más de la capacidad solubilizadora del extractante y de su interacción con los analitos que del tipo de matriz a ser empleado. Por lo que se fijó un volumen de 10 mL de cada surfactante en concentraciones de 5% (v/v) para el POLE y 4% (v/v) para el Genapol X-080 respectivamente, para la extracción de los pesticidas en piel de tomate.

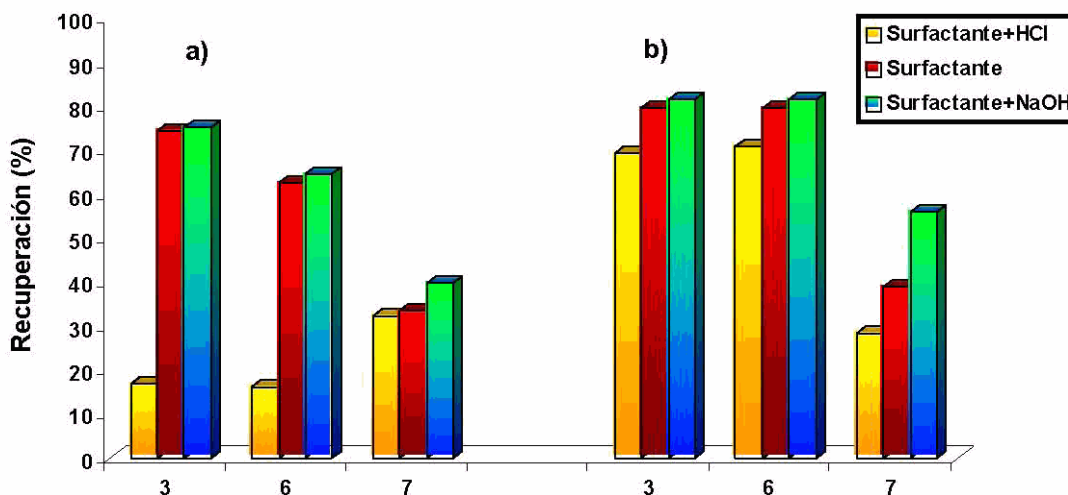
## Efecto del pH

El pH de la disolución extractante es una variable a tener en cuenta, ya que puede provocar la degradación de alguno de los compuestos en estudio. El Diazinón, por ejemplo, se hidroliza rápidamente a pHs bajos o altos debido a procesos de catálisis básica y también ácida (62-64, 69). De manera que se estudió el efecto del pH en la extracción de una serie de muestras de piel de tomate previamente enriquecidas. Éstas fueron extraídas con 9.5 mL de las disoluciones de surfactante a las concentraciones fijadas, junto con 0.5 mL de HCl (1M) o NaOH (0.1 M) en cada caso, a fin de utilizar un volumen final total de 10 mL, como se había prefijado. Las muestras fueron irradiadas en el microondas durante 5 minutos a 300 W de potencia y posteriormente a su filtración, fueron analizadas en el sistema cromatográfico.

El pH de los extractos obtenidos fue muy similar para los dos surfactantes: para los extractos ácidos se obtuvieron valores de pH de 2.7 y 2.6 y para los básicos de 6.2 y 6.2 para POLE y Genapol respectivamente. En la Figura III.17 se presentan los resultados obtenidos para el Paratión-metil, Paratión-etil y Diazinón, donde puede observarse que los porcentajes de extracción obtenidos fueron ligeramente superiores cuando se añadía NaOH independientemente del surfactante a emplear.

Comparando los resultados obtenidos en presencia de NaOH con aquellos en los que se añadió HCl se puede interpretar que el pH de la disolución extractante afecta claramente a la eficiencia de la extracción, siendo mejor a pH más básico. Por lo que se decidió añadir 0.5 mL de NaOH (0.1 M) en los estudios posteriores.

**Figura III.17.-** Estudio del efecto del pH en la recuperación de pesticidas organofosforados en piel de tomate. a) POLE, b) Genapol X-080. Compuestos representados: 3.-Paratión-metil, 6.-Paratión-etil, 7.-Diazinón.



### Efecto del tiempo y potencia de radiación

Al igual que en la optimización de la extracción de pesticidas organofosforados en suelos, en este caso también se estudió el efecto de las condiciones de radiación en la eficiencia de extracción. Para ello se siguió un diseño experimental central compuesto de dos niveles, junto con un diseño ortogonal compuesto en estrella y tres puntos centrales, de forma que con el análisis de 11 ensayos en total se puede hacer una evaluación directa de las variables consideradas.

Se tomaron, por lo tanto, una serie de muestras de piel de tomate que fueron previamente enriquecidas y se extrajeron en diferentes condiciones de



radiación, tal y como se aprecia en la Tabla III.9. En este caso las condiciones de radiación estudiadas son menos agresivas que en el estudio de los suelos, a fin de evitar la descomposición de la matriz.

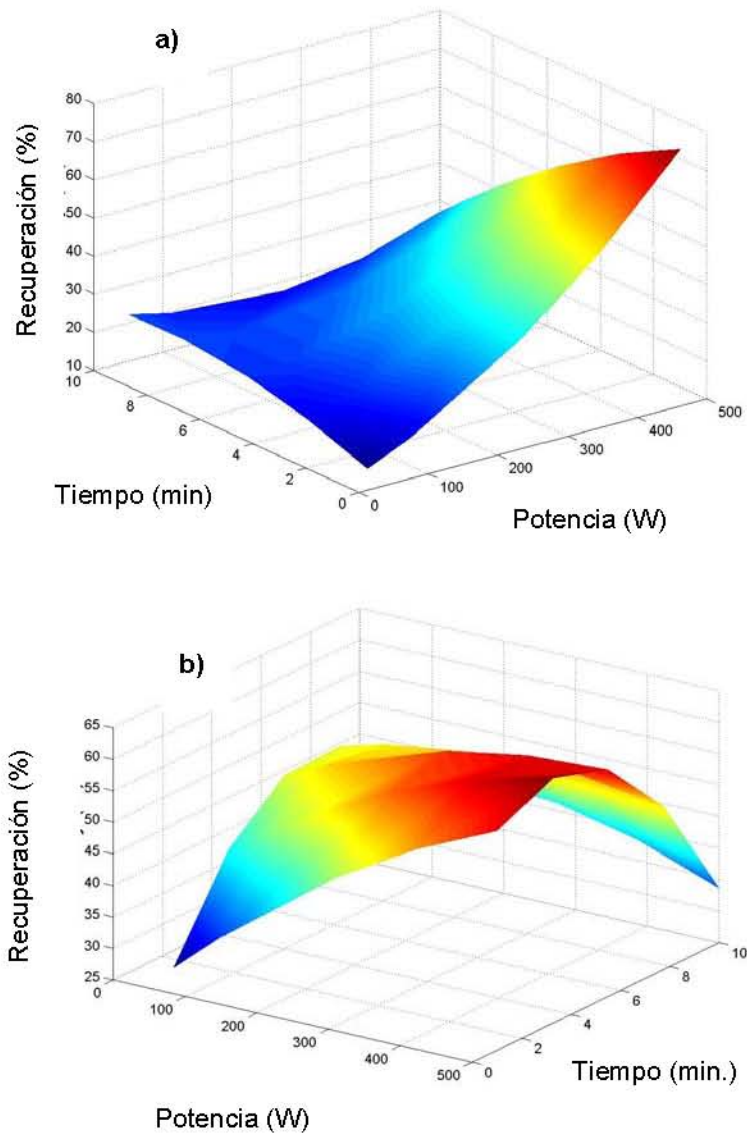
**Tabla III.9.-** Ensayos de tiempo y potencia de radiación empleados para el estudio del efecto de estos parámetros en la recuperación de pesticidas de piel de tomate.

Nº Ensayo	Potencia (W)	Tiempo (min)
1	50	1
2	50	5.5
3	50	10
4	275	1
5	275	5.5
6	275	5.5
7	275	5.5
8	275	10
9	500	1
10	500	5.5
11	500	10

Los resultados obtenidos muestran para todos los compuestos de forma general, un máximo de recuperación a tiempos cortos (1 min) y potencias altas (500W) cuando se emplea POLE como extractante. En la Figura III.18a se muestra la superficie de respuesta del Metidati3n como ejemplo.

En el caso del Genapol X-080, Figura III.18b, el máximo se desplaza a tiempos intermedios (5.5 min) y potencias ligeramente más bajas (400W). De manera que finalmente se escogieron 1min y 500W para el POLE, y 5.5 min y 400W para el Genapol X-080, como las condiciones más adecuadas para la extracci3n de los pesticidas con cada uno de ellos.

**Figura III.18.-** Superficies de respuesta obtenidos del estudio del tiempo y potencia de radiación microondas en los pesticidas organofosforados: a) Metidatión extraído con POLE y b) Paratión-metil extraído con Genapol X-080.



En la Tabla III.10 se presentan los resultados obtenidos para la extracción de los pesticidas organofosforados en estudio en las condiciones óptimas para cada surfactante, obtenidos a partir de las curvas de calibrado que se recogen en la Tabla A.7 del Anexo I de la presente Tesis Doctoral. En dicha Tabla puede observarse que la utilización de POLE como extractante conduce a mejores resultados que el Genapol X-080 en la recuperación de los analitos de interés.

**Tabla III.10.-** Recuperaciones de los pesticidas organofosforados en estudio usando la metodología MAME en piel de tomate.

Compuesto	Recuperación (%) <sup>a</sup>	
	POLE	Genapol (X-080)
Dimetoato	--- <sup>b</sup>	105.0
Metidación	86.3	28.6
Paratión-metil	90.3	85.7
Malatión	72.7	57.1
Etoprofos	74.3	--- <sup>b</sup>
Paratión-etil	87.5	78.7
Diazinón	93.3	92.7
Clorpirifos	35.0	29.5

<sup>a</sup> Media de tres determinaciones

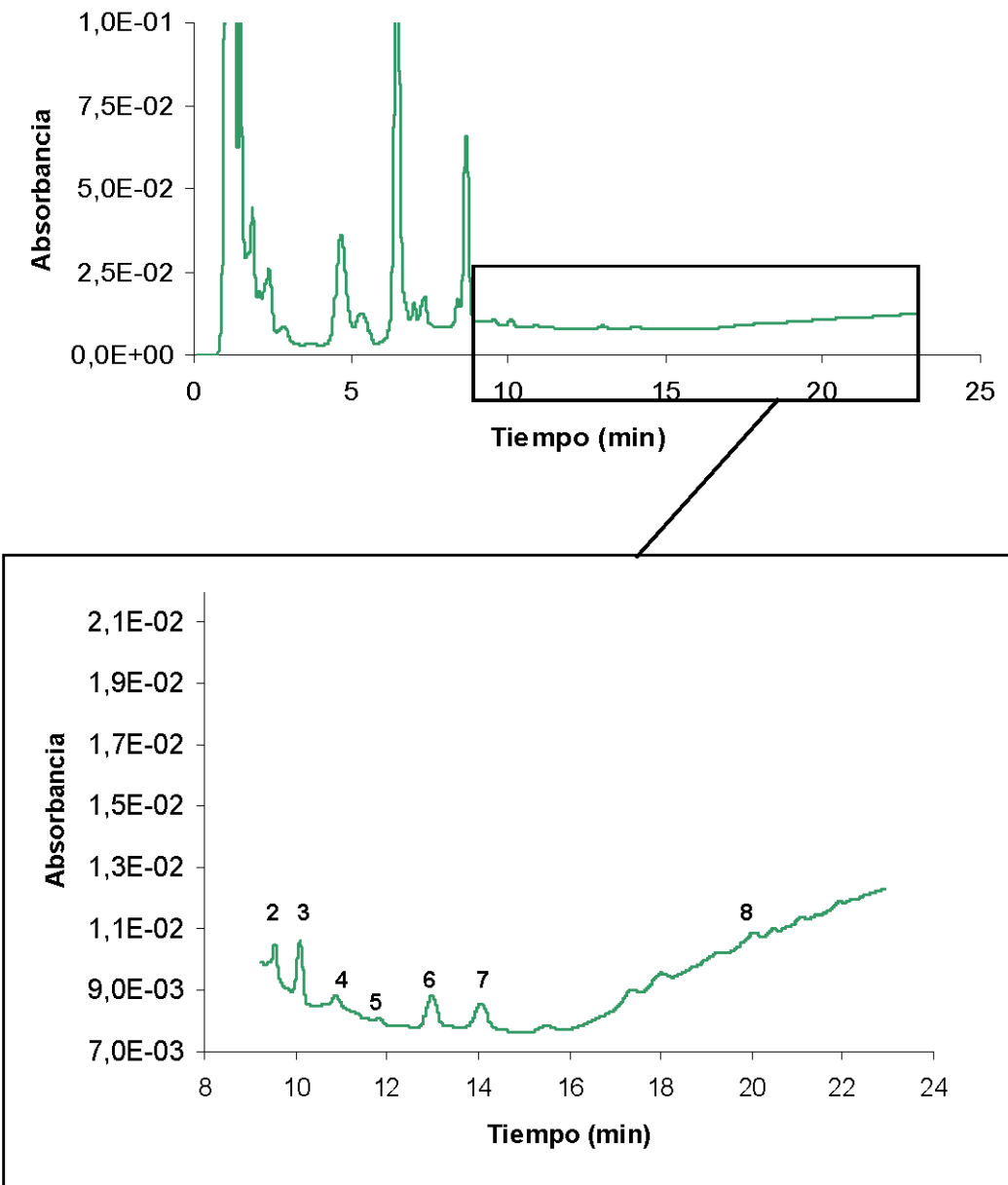
<sup>b</sup> Interferencia con la matriz

### III.2.2 Parámetros analíticos y Validación del método

A fin de estudiar la reproducibilidad del método, éste fue aplicado a seis muestras de piel de tomate previamente enriquecidas con la mezcla de pesticidas y los extractos fueron analizados en el sistema HPLC-UV en las condiciones establecidas para su correcta separación e identificación. La Figura

III.19 muestra el cromatograma obtenido para un extracto de piel de tomate utilizando POLE como extractante.

Figura III.19.- Cromatograma del extracto de una muestra de piel de tomate acondicionada con la mezcla de pesticidas organofosforados bajo la metodología de extracción MAME empleando POLE como extractante.



Las desviaciones estándar relativas obtenidas se muestran en la Tabla III.11, donde se aprecia que para todos los pesticidas estudiados se obtienen valores de desviación estándar inferiores a 4.8% y 4.9 para POLE y Genapol X-080 respectivamente.

Finalmente, se calcularon también los límites de detección de cada analito empleando la relación señal/ruido ( $s/n=3$ ) (57) una vez aplicado el método optimizado. De igual forma, los resultados se muestran en la Tabla III.11 en la que se aprecian valores entre 0.6 y 6.3  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  para el POLE y de 2.0 a 10.6  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  para el Genapol X-080. Estos valores permiten el análisis de este tipo de compuestos en concentraciones muy por debajo de los "Niveles Máximos" (Maximum Residue Levels, M.R.L) establecidos por la legislación europea vigente para algunos de estos pesticidas en tomate, cuya concentración oscila entre 0.3 y 1  $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$  (67). Por lo que este método puede ser una alternativa real a los métodos convencionales y ser empleado en laboratorios de análisis de rutina.

Debido a que el método MAME optimizado que emplea POLE como extractante proporciona mejores resultados, y con objeto de probar la validez del mismo, éste fue aplicado a la extracción de los pesticidas en una muestra de piel de tomate enriquecida con una mezcla estándar certificada (Pesticide Mix 1, EPA Method 914) que contiene cuatro de los pesticidas organofosforados en estudio (Paratión-metil, Malatión, Paratión-etil y Diazinón). En la Tabla III.12, se muestran los resultados obtenidos para esta mezcla certificada.

**Tabla III.11.-** Parámetros analíticos del método MAME aplicado a la extracción de pesticidas organofosforados en piel de tomate, con los surfactantes POLE y Genapol X-080.

Compuesto	POLE		GENAPOL X-080	
	R.S.D. <sup>a</sup> (%)	L.O.D. <sup>b</sup> (ng.g <sup>-1</sup> )	R.S.D. <sup>a</sup> (%)	L.O.D. <sup>b</sup> (ng.g <sup>-1</sup> )
Dimetoato	--- <sup>c</sup>	--- <sup>c</sup>	2.2	5.4
Metidación	2.5	2.7	4.1	3.3
Paratión-metil	3.9	0.6	3.9	2.0
Malatión	3.4	1.0	4.9	5.9
Etoprofos	3.1	5.6	--- <sup>c</sup>	--- <sup>c</sup>
Paratión-etil	4.8	6.3	4.7	2.0
Diazinón	3.5	5.5	0.7	10.6
Clorpirifos	2.5	2.4	2.1	2.0

<sup>a</sup> Desviación Estándar Relativa.<sup>b</sup> Limite de detección.<sup>c</sup> Interferencia con la matriz.**Tabla III.12.-** Aplicación de la metodología MAME empleando POLE 5% (v/v) para la extracción de una muestra de piel de tomate enriquecida con una mezcla estándar certificada (Pesticide Mix 1, EPA Method 914)<sup>a</sup>.

Compuesto	MAME		
	Añadido (μg.g <sup>-1</sup> )	Encontrado (μg.g <sup>-1</sup> )	Recuperación (%)
Paratión-m	2.0	1.7 ± 0.06	87.0
Malatión	2.0	1.2 ± 0.21	59.5
Paratión-e	2.0	1.7 ± 0.03	86.0
Diazinón	2.0	1.5 ± 0.01	76.0

<sup>a</sup> Media de tres determinaciones.

Los resultados obtenidos muestran la alta eficiencia del método propuesto teniendo en cuenta que se trata de matrices bastante complejas.

El método desarrollado para la extracción de pesticidas utilizando la metodología MAME usando POLE como extractante se comparó, con objeto de comprobar su eficacia; con los resultados encontrados aplicando el método de Luke y colaboradores para la determinación de este tipo de pesticidas (70), modificado por el Instituto Tecnológico de Canarias, consistente en la extracción mediante ultrasonidos de los pesticidas y posterior determinación por cromatografía de gases con doble acoplamiento de espectrómetro de masas como detector (GC/MS/MS), pero, a fin de tener en cuenta el posible efecto de "envejecimiento" en este tipo de matriz se realizaron los mismos análisis después de 48 horas. En este caso no se puede hablar de un tiempo de envejecimiento de meses como en los suelos ya que en el caso de las frutas y verduras este tiempo viene limitado por el tiempo de vida de las mismas una vez separadas de la planta. Lo que se pretende más bien con este pequeño estudio es comprobar en qué medida afecta el tiempo de contacto a la eficiencia de extracción de nuestro método, y contrastar estos resultados con otro método diferente.

Los resultados obtenidos, Tabla III.13, son bastante comparables después de 48 h. de contacto entre el analito y la matriz. Por lo que se demuestra que los analitos efectivamente interaccionan más fuertemente con la matriz a medida que aumenta el tiempo de contacto, y que nuestro método es igual de eficaz al que emplea ultrasonidos y detección GC/MS/MS en cuanto a que extrae todos los compuestos presentes en la muestra y en la misma proporción.

**Tabla III.13.-** Comparación de las metodologías MAME-HPLC/UV y Ultrasonidos-GC/MS/MS en la extracción y determinación de una muestra de piel de tomate enriquecida con una mezcla estándar certificada (Pesticide Mix 1, EPA Method 914), después de 48 h. de contacto<sup>a</sup>.

Compuesto	Añadido ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	MAME HPLC/UV	Ultrasonidos GC/MS/MS
		Encontrado ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Encontrado ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )
Paratión-metil	2.0	1.1 $\pm$ 0.09	1.0 $\pm$ 0.08
Malatión	2.0	0.8 $\pm$ 0.06	0.6 $\pm$ 0.07
Paratión-etil	2.0	1.6 $\pm$ 0.14	1.0 $\pm$ 0.01
Diazinón	2.0	0.9 $\pm$ 0.02	1.4 $\pm$ 0.03

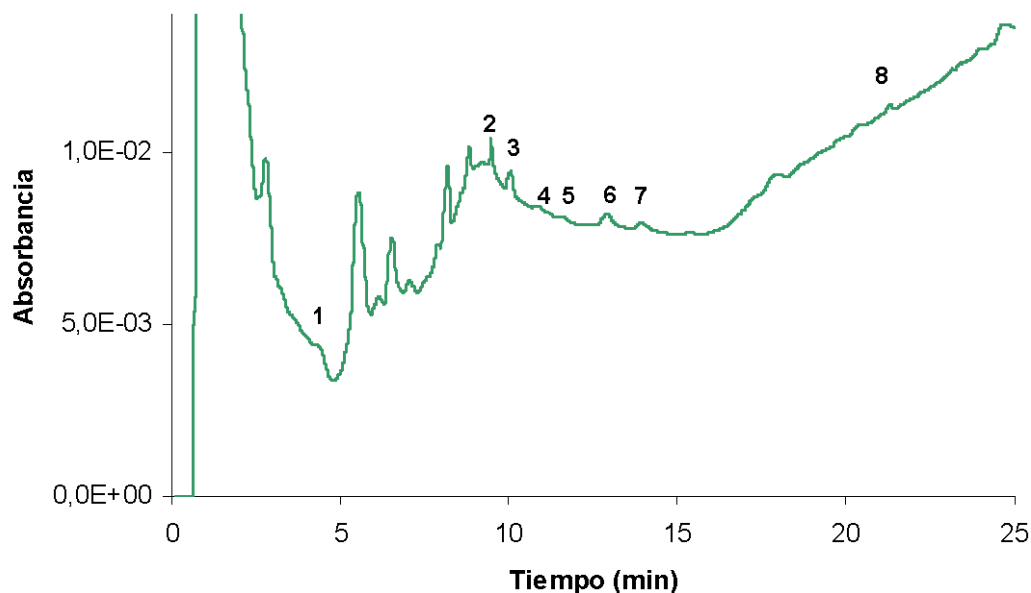
<sup>a</sup> Media de tres determinaciones

### III.3.2.3 Aplicación a otros vegetales

Con objeto de comprobar la aplicabilidad del método propuesto, éste fue aplicado a la extracción y análisis de la mezcla de pesticidas en estudio en otras muestras vegetales, tales como lechugas y pimientos rojos, en las condiciones optimizadas para los tomates. En la Figura III.20 se muestra el cromatograma correspondiente a un extracto de lechuga después de acondicionarlo con la mezcla de pesticidas y aplicar el método propuesto utilizando POLE como extractante. Podemos observar cómo en estos vegetales, en estas condiciones se obtiene una adecuada separación de todos los analitos en un tiempo razonable e análisis.



**Figura III.20.-** Cromatograma del extracto de una muestra de lechuga acondicionada con la mezcla de pesticidas organofosforados bajo la metodología de extracción MAME empleando POLE como extractante.



La cuantificación de los mismos se ha hecho a partir de las curvas de calibrado recogidas en la Tabla A.7 del Anexo I de la presente Tesis Doctoral. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla III.14 donde se observa que las recuperaciones son mejores cuando los compuestos son extraídos de lechugas, variando entre 60 y 100% para todos los analitos, mientras que en los pimientos las recuperaciones oscilan entre 32 y 86 % sin poder detectar el Etoprofos debido a una fuerte interferencia de la matriz.

**Tabla III.14.-** Aplicación de la metodología MAME optimizada usando POLE como extractante, a la extracción de pesticidas organofosforados en diferentes muestras vegetales<sup>a</sup>.

Compuesto	Recuperación (%)	
	Lechuga	Pimiento rojo
Dimetoato	94.5 ± 0.4	85.8 ± 1.0
Metidación	84.2 ± 0.6	67.4 ± 3.4
Paratión-metil	83.8 ± 3.0	66.7 ± 5.4
Malatión	76.0 ± 8.9	50.0 ± 2.0
Etoprofos	100.9 ± 7.2	--- <sup>b</sup>
Paratión-etil	83.5 ± 3.0	60.8 ± 2.9
Diazinón	59.0 ± 1.7	49.3 ± 2.2
Clorpirifos	60.0 ± 1.0	32.4 ± 3.5

<sup>a</sup> Media de tres determinaciones.<sup>b</sup> Interferencia con la matriz.

Los resultados demuestran que el método desarrollado puede ser aplicado a otro tipo de muestras vegetales, aunque quizás habría que variar las condiciones experimentales para mejorar los porcentajes de recuperación, sobretodo en el caso de los pimientos.

### III.4 BIBLIOGRAFÍA

- 1) Doong, R.; Lee, C. *Analyst* 124 (1999) 1284.
- 2) Covaci, A.; Van de Vijver, K.; DeCoen, W.; Das, K.; Bouquegneau, J.M.; Blust, R.; Schepens, P. *Mar. Pollut. Bull.* 44 (2002) 1157.
- 3) EPA Method 8280A, The analysis of Polychlorinated Dibenzo-p-Dioxins and Polychlorinated Dibenzofurans by High Resolution Gas Chromatography/Low Resolution Mass Spectrometry (HRGC/LRMS), Washington D.C., 1996, pp. 1-55.
- 4) Heemke, O.P.; Norbert, T.; Wenclawiak, B.W. *Anal. Chem.* 69 (1997) 2171.
- 5) Sayder, J.; Grob, R.; McNally, M.; Gostdyk, T. *Anal. Chem.* 64 (1992) 1940.
- 6) Cook, J.; Beckett, M.P.; Reliford, B.; Hammock, W.; Engel, M. J. *AOAC Int.* 82 (1999) 1419.
- 7) Lino, C.M.; da Silveira, M.I.N. *J. Chromatogr. A* 769 (1997) 275.
- 8) Manirakiza, P.; Covaci, A.; Schepens, P. *Chromatographia* 52 (2000) 787.
- 9) Lehotay, S.J.; Eller, K.I.; J. *AOAC Int.* 78 (1995) 821.
- 10) Mannila, M.; Koistinen, J.; Vartiainen, T. *J. Chromatogr. A* 975 (2002) 189.
- 11) Adou, K.; Bontoyan, W.R.; Sweeney, P.J. *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 4153.
- 12) Saito, K.; Takekuma, M.; Ogawa, M.; Kobayashi, S.; Sugawara, Y.; Ishizuka, M.; Nakazawa, H.; Matsuki, Y. *Chemosphere* 53 (2003) 137.
- 13) Pastor, A.; Vázquez, E.; Ciscar, R.; de la Guardia, M. *Anal. Chim. Acta* 344 (1997) 241.
- 14) Eljarrat, E.; Caixach, J.; Rivera, J. *Water Res.* 25 (2001) 2799.
- 15) Senthil Kumar, K.; Kannan, K.; Corsolini, S.; Evans, T.; Giesy, J.P.; Nakanishi, J.; Masunaga, S. *Environ. Pollut.* 119 (2002) 151.
- 16) Preud'homme, H. ; Potin-Gautier, M. *Anal Chem.* 75(22) (2003) 6109.

- 17) Mol, H.G.J.; van Dam R.C. J.; Steijger O.M. J. *Chromatogr. A* 1015 (2003) 119.
- 18) Pylypiw, H.M., Arsenault, T.L., Thetford, C.M., Mattina, M.J.I., *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 3522.
- 19) López-Ávila, V.; Young, R.; Benedicto, J.; Ho, P.; Kim, R.; Beckert, W.F. *Anal. Chem.* 67 (1995) 2096.
- 20) Abu-Samra, A.; Morris, J.S.; Koirtiyohann, S.R. *Anal. Chem.* 47 (1975) 1475.
- 21) Camel, V. *TrAC Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 229.
- 22) Molins, C.; Hogendoorn, E.A.; Dijkman, E.; Heusinkveld, H.A.G.; Baumann, R.A. *J. Chromatogr. A*, 869 (2000) 487.
- 23) Chiou, C.S.; Jiang, S.J.; Danadurai, K.S.K. *Spectrochim. Acta, Part B* 56 (2001) 1133.
- 24) Jayaraman, S.; Pruell, R.J.; McKinney, R. *Chemosphere* 44 (2001) 181.
- 25) Pino, V.; Ayala, J.H.; Afonso, A.M.; González, V. *J. Chromatogr. A* 869 (2000) 515.
- 26) Mahugo Santana, C; Sosa Ferrera, Z.; Santana Rodríguez, J.J. *Anal. Chim. Acta* 524 (2004) 133.
- 27) Bianco Prevot, A.; Gulmini, M.; Zelano, V.; Pramauro, E. *Anal. Chem.* 73 (2001) 3790.
- 28) Pelizzetti, E.; Pramauro, E. *Anal. Chim. Acta* 169 (1985) 1.
- 29) Watari, H. *J. Chromatogr. A* 780 (1997) 93.
- 30) Sparr Eskilsson, C.; Björklund, E. *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 227.
- 31) Vazquez Blanco, E.; Lopez Mahia, P.; Muniategui Lorenzo, S.; Prada Rodríguez, D.; Fernandez Fernandez, E. *Fresenius J. Anal. Chem.* 366 (2000) 283.
- 32) Enders, B.; Schwedt, G. *GIT Fachz. Lab.* 40 (1996) 172.
- 33) Kovacs, A.; Ganzler, K.; Simon-Sarkadi, L.; Lebensm, Z. *Unters Forsch. A* 207 (1998) 26.

- 34) Sparr Eskilsson, C.; Björklund, E.; Mathiasson, L.; Karlsson, L.; Torstensson, A. J. *Chromatogr. A* 840 (1999) 59.
- 35) Chee, K.K.; Wong, M.K.; Lee, H.K. *J. Chromatogr. A* 723 (1996) 259.
- 36) Chee, K.K.; Wong, M.K.; Lee, H.K. *Environ. Monit. Assess.* 44 (1997) 587.
- 37) Pensado, L.; Casais, C.; Mejuto, C.; Cela, R. *J. Chromatogr. A* 869 (2000) 505.
- 38) Rodríguez, L.; Santamarina, M.; Bollain, M.H.; Mejuto, M.C.; Cela, R. *J. Chromatogr. A* 774 (1997) 379.
- 39) Hoogerbrugge, R.; Molins, C.; Baumann, R.A. *Anal. Chim. Acta* 348 (1997) 247.
- 40) Font, N.; Hernandez, F.; Hogendoorn, E.A.; Baumann, R.A.; van Zoonen, P. *J. Chromatogr. A* 798 (1998) 179.
- 41) Chee, K.K.; Wong, M.K.; Lee, H.K. *Chromatographia* 42 (1996) 378.
- 42) Ganzler, K.; Salgo, A.; Valko, K. *J. Chromatogr.* 371 (1986) 299.
- 43) Padrón, C.; Eiguren, A.; Sosa, Z.; Santana, J.J. *J. AOAC Int.* 85 (2002) 44.
- 44) Stout, S.J.; Babbitt, B.W.; DaCunha, A.R.; Safarpour, M.M. *J. AOAC Int.* 81 (1998) 1054.
- 45) Budzinski, H.; Papineau, A.; Baumard, P.; Garrigues, P. *C.R. Acad. Sci. Paris* 321 (1995) 69.
- 46) Dupont, G.; Delteil, C.; Camel, V.; Bermond, A. *Analyst* 124 (1999) 453.
- 47) López-Ávila, V.; Young, R.; Beckert, W.F. *Anal. Chem.* 66 (1994) 1097.
- 48) Langenfeld, J.J.; Hawthorne, S.B.; Miller, D.J.; Pawliszyn, J. *Anal. Chem.* 67 (1995) 1727.
- 49) Björklund, E.; Bøwadt, S.; Mathiasson, L.; Hawthorne, S.B. *Environ. Sci. Technol.* 33 (1999) 2193.
- 50) Hawthorne, S.B.; Björklund, E.; Bøwadt, S.; Mathiasson, L. *Environ. Sci. Technol.* 33 (1999) 3152.

- 51) Kopinke, F.; Pörschmann, J.; Stottmeister, U. *Environ. Sci. Technol.*, 29 (1995) 941.
- 52) Stout, S.J.; daCunha, A.R.; Allardice, D.G. *Anal. Chem.* 68 (1996) 653.
- 53) Xiong, G.; Liang, J.; Zou, S.; Zhang, Z. *Anal. Chim. Acta* 371 (1998) 97.
- 54) Mattina, M.J.I.; Berger, W.A.I.; Denson, C.L.; *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 4691.
- 55) Ganzler, K.; Salgo, A. *Z. Unters. Forsch.* 184 (1987) 274.
- 56) Eljarrat, E.; Caixach, J.; Rivera, J. *Chemosphere* 36 (1998) 2359.
- 57) Lindsay, S. (1992) *High Performance Liquid Chromatography*, John Wiley and Sons, New York, USA.
- 58) EPA Method 8290, Polychlorinated Dibenzo-p-Dioxins (PCDDs) and Polychlorinated Dibenzofurans (PCDFs) by High Resolution Gas Chromatography/High Resolution Mass Spectrometry (HRGC/HRMS), Washington D.C., 1994, pp. 1-71.
- 59) Llompарт, M.P.; Lorenzo, R.A.; Paré, J.R. *Analyst* 122 (1997), 133.
- 60) EPA Method 3540C, Soxhlet Extraction, Washington D.C., 1996, pp. 1-8.
- 61) Shu, Y.Y.; Lai, T.L.; Lin, H-S; Yang, T.C.; Chang, C.P. *Chemosphere* 52 (2003) 1667.
- 62) Racke, K.D. (1992) Degradation of organophosphorus insecticides in environmental matrices. In: Chambers, J.E., Levi, P.E. (Eds.), *Organophosphates: Chemistry, Fate, and Effects*. Academic Press, San Diego, USA.
- 63) Pehkonen, S.O., Zhang, Q. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 32 (2002) 17.
- 64) Dannenberg, A., Pehkonen, S.O. *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 325.
- 65) Dowling, K.C., Lemley, A.T. *J. Environ. Sci. Health B* 30 (5) (1995) 585.
- 66) Noblet, J.A., Smith, L.A., Suffet, I.H. *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996) 3685.
- 67) European Community Position for the 33<sup>rd</sup> Session of the Codex Committee on Pesticide Residues, The Hague, April 2001. Circular Letter CL 2000/27-PR.

- 68) Abou-Arab, A.A.K. Food Chemistry 65 (1999) 509.
- 69) Freed, V.H.; Chiou, C.T.; Schmedding, D.W. J. Agric. Food Chem. 27 (1979) 706.
- 70) Luke, M. A., Froberg, J. E. and Masumoto, H. T. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 58 (1975) 1020.





## CAPÍTULO IV .- EXPERIMENTAL



## **IV.1 REACTIVOS Y DISOLUCIONES**

### **IV.1.1 Dibenzo-p-dioxinas**

Las dibenzo-p-dioxinas utilizadas (Tabla I.1) fueron obtenidas de Accustandard, Inc. (New Haven, USA), con un 98% de pureza. Las disoluciones patrón de las mismas se prepararon en metanol en una concentración de 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  cada una de ellas, y se almacenaron a 4°C. A partir de ellas, se tomaron las cantidades necesarias para la preparación de las curvas de calibrado y enriquecimiento de las muestras.

### **IV.1.2 Pesticidas Organofosforados**

Los pesticidas organofosforados empleados, indicados en la Tabla I.4, fueron suministrados por Dr. Ehrenstorfer, (Augsburg, Alemania), con un 98-99% de pureza todos ellos. Las disoluciones patrón de cada pesticida fueron preparadas en metanol a una concentración de 100  $\text{mg L}^{-1}$  y almacenados a 4°C.

La mezcla de pesticidas estándar certificada (Pesticide Mix 1) también fue proporcionada por Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemania).

### **IV.1.3 Surfactantes**

Los surfactantes no iónicos empleados; Polioxietilén 10 Lauril Éter (POLE) y Oligoetilén Glicol Monoalquil Éter (Genapol X-080) fueron obtenidos de

Sigma (St. Louis, MO, USA) y sus disoluciones fueron preparadas en agua Milli-Q en concentraciones de 10% (v/v), a partir de las cuales se tomaron los volúmenes necesarios para su utilización en los distintos procedimientos de extracción.

#### IV.1.4 Aditivos

La fuerza iónica de las disoluciones extractantes se modificó añadiendo cloruro sódico (NaCl) de la marca Panreac Química, S.A. (Barcelona, España).

Para modificar el pH de las disoluciones extractantes se emplearon ácido clorhídrico (HCl, 1M) e hidróxido sódico (NaOH, 0.1 M) de la marca Scharlau (Barcelona, España).

Para la determinación del contenido de materia orgánica de los suelos se utilizó ácido sulfúrico del 96 % de riqueza, dicromato potásico y sal de Mohr (sulfato de amonio hierro II hexahidratado), de calidad "pro análisis", también de la marca Panreac Química, S.A. (Barcelona, España).

#### IV.1.5 Disolventes

El agua utilizada (Milli-Q), tanto para la preparación de disoluciones como para la preparación de la fase móvil, se obtuvo de un sistema de purificación de la marca Millipore (MA, EE.UU.).

El Metanol calidad HPLC y HPLC-gradiente, diclorometano, tolueno, acetato de etilo y ciclohexano fueron adquiridos de Panreac Química, S.A. (Barcelona, España).

Los disolventes empleados para la fase móvil (metanol y agua) fueron filtrados a través de filtros de membrana de nylon de 0.22  $\mu\text{m}$ ; los demás se utilizaron directamente sin ningún tratamiento.

## **IV.2 APARATOS**

### **IV.2.1 Baño termostatzado**

El proceso de extracción por *punto de nube* se realizó utilizando un baño termostatzado de la marca Selecta (Barcelona, España), modelo Tectron 3473200 y la posterior separación de las fases en una centrifuga también de la marca Selecta, modelo Mixtasel.

### **IV.2.2 Embudos de decantación**

Para la extracción líquido-líquido se empleó un embudo de decantación de 50 mL de la marca Schott Duran (Alemania).

### **IV.2.3 Microondas**

El equipo de extracción asistida por microondas consta de un sistema de digestión por microondas modelo Multiwave, de la marca Anton Paar, (Graz, Austria), con control de tiempo y potencia, sensores de temperatura y presión interna, y frecuencia de 2450 MHz a potencia total, con un rotor (6EVAP) de 6 vasos tipo MF100, para un volumen máximo de 50 mL.

### **IV.2.4 pHmetro**

El pHmetro empleado para la caracterización de los suelos así como para la medida del pH de las disoluciones extractantes modificadas, es de la marca Crison (Madrid, España)

### **IV.2.5 Soxhlet**

Para la validación de los métodos propuestos correspondientes a la extracción de dioxinas y pesticidas de sedimentos marinos y suelos

respectivamente, se empleó un sistema de extracción Soxhlet de la marca Pobel (Madrid, España) y capacidad 100 mL.

#### **IV.2.6 Ultrasonidos**

Para la validación del método propuesto correspondiente a la extracción de pesticidas de piel de tomate, se empleó un sistema de extracción por ultrasonidos de la marca Selecta (Barcelona, España).

#### **IV.2.7 Cromatografía líquida de alta resolución**

Para la determinación cromatográfica se utilizó un sistema compuesto por dos bombas Waters 515, un inyector Rheodyne 7725i y un detector visible-uv de fotodiodos (PDA) modelo 996, también de Waters (Waters Associates, Milford, MA). La columna utilizada fue una Nova-pack C18, 3,9 x 150 mm (con relleno de partículas de diámetro 4  $\mu\text{m}$ ) de Waters. El software utilizado para la obtención de los cromatogramas y su posterior tratamiento fue Millenium versión 2.15 de Waters.

Para el tratamiento estadístico de los datos se hizo uso del Software Statgraphics de Statistical Graphics Corporation.

Para la representación gráfica de los resultados se emplearon los programas Matlab versión 5.3 y el programa Microsoft Excel de Microsoft Office XP.

#### **IV.2.8 Cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas**

Para el análisis de los extractos de pesticidas de piel de tomate después de aplicar el método de extracción por ultrasonidos, se utilizó un cromatógrafo de gases modelo (CP-3800) de la marca Varian (Madrid, España) acoplado a un espectrómetro de masas modelo Saturn 2200 también de Varian.

### **IV.3 PROCEDIMIENTOS**

#### **IV.3.1 Determinación de la temperatura de punto de nube**

Para obtener la temperatura de *punto de nube* de cada surfactante se prepararon disoluciones con concentraciones diferentes en tubos de ensayo graduados y cerrados. Estos tubos se introdujeron en un baño termostatzado en el que la temperatura se fue aumentando gradualmente cada 5°C. En el momento en el que aparece la turbidez característica del proceso, correspondiente a la temperatura en la que se separan las fases, se toma nota de esa temperatura y se representa gráficamente frente a la concentración de surfactante presente en la disolución. La gráfica resultante representa la curva de coexistencia de dicho surfactante. Las coordenadas del punto de intersección de las tangentes a dicha curva nos proporcionan los datos de temperatura y concentración de *punto de nube* del surfactante.

#### **IV.3.2 Determinación de la relación de volúmenes**

La relación de volúmenes (cociente entre el volumen inicial y volumen de fase rica en surfactante), se determina a partir de la medida directa del volumen de fase rica en surfactante en el tubo de ensayo graduado después del calentamiento en las condiciones de punto de nube, centrifugado y separación de fases de una disolución inicial de 10 mL. Este proceso generalmente se realiza en distintas condiciones experimentales (con diferentes concentraciones de surfactante y distintos volúmenes del mismo) a fin de determinar el factor de preconcentración más conveniente.

### IV.3.3 Análisis cromatográfico

#### *IV.3.3.1 Cromatografía líquida*

El análisis cromatográfico de dioxinas y pesticidas en presencia de los diferentes surfactantes se realizó como se describe en el Anexo I de esta Tesis. En todos los casos el volumen inyectado en el cromatógrafo fue de 20  $\mu$ L y por triplicado para asegurar el llenado completo del inyector. Los tiempos de retención obtenidos corresponden al valor medio de cinco determinaciones.

#### *IV.3.3.2 Cromatografía de gases*

Con objeto de comparar los resultados obtenidos con el método propuesto con los encontrados con otras técnicas, los extractos correspondientes a las muestras de piel de tomate se analizaron por cromatografía de gases y detección gases masas/masas. Se utilizó inyección de gran volumen (10  $\mu$ L) en columna capilar, asistida por inyector programable en temperatura y carbofrit inserto para limpieza de la muestra en el mismo cuerpo del inyector. Detección por masas/masas en un sistema de trampa de iones siendo la primera ionización interna, dentro de la trampa de iones.

### IV.3.4 Extracción y preconcentración en muestras líquidas por Punto de Nube

#### *IV.3.4.1 Extracción y preconcentración de dibenzo-p-dioxinas policloradas*

Las disoluciones acuosas con la mezcla de dioxinas en los diferentes surfactantes estudiados y la sal a la concentración elegida, se mantienen en un baño termostático a temperatura constante (15°C por encima de la



temperatura de *punto de nube* de cada surfactante) durante los periodos de tiempo óptimos de cada surfactante. Una vez fuera del baño, los tubos se introducen en la centrifuga durante 5 minutos a 3500 r.p.m. A fin de evitar que en este punto las fases se mezclen por un descenso de la temperatura, los portatubos de la centrifuga se mantienen en una estufa a la misma temperatura del baño, hasta el momento de su utilización.

Después de centrifugar las disoluciones, se introduce una jeringuilla con una aguja larga que atraviesa la fase rica en surfactante (situada en la parte superior del sistema) y que llega hasta el fondo del tubo, y desde ahí se retira la fase acuosa.

Posteriormente se añade 1 mL de agua a fin de reducir la viscosidad de la fase rica en surfactante y evitar interferencias en el posterior análisis cromatográfico.

#### ***IV.3.4.2 Extracción y preconcentración de pesticidas organofosforados***

De igual forma que en el caso anterior, las disoluciones acuosas con la mezcla de pesticidas, surfactantes y la sal a las concentraciones fijadas, se mantienen en un baño termostatzado a temperatura constante (15°C por encima de la temperatura de *punto de nube* de cada surfactante) durante los periodos óptimos de cada surfactante. Una vez fuera del baño, los tubos se centrifugan durante 5 minutos a 3500 r.p.m., y la extracción se realiza tal y como se describió anteriormente. En este caso sólo se añadió 0.1 mL de metanol agua (50:50) a los extractos obtenidos a fin de reducir la viscosidad y evitar interferencias en el posterior análisis cromatográfico, sin perjuicio de una notable pérdida del factor de preconcentración.

#### **IV.3.5 Extracción y preconcentración de dibenzo-p-dioxinas policloradas y pesticidas en muestras líquidas reales mediante la metodología Punto de Nube**

Se tomaron 4 mL de las muestras de agua de mar o agua depurada y se les añadió el volumen necesario de la disolución que contenía los analitos para obtener la concentración final deseada. A continuación se añadió la disolución de surfactante, la sal, y se enrasó con agua Milli-Q hasta alcanzar un volumen final de 10 mL. La extracción, preconcentración y adecuación al análisis es coincidente con el apartado anterior.

Para la extracción de la muestra acuosa enriquecida con la mezcla de pesticidas estándar certificada se procedió exactamente de la misma manera.

#### **IV.3.6 Extracción Líquido-líquido de dibenzo-p-dioxinas policloradas**

Se introducen 10 mL de muestra previamente enriquecida con la mezcla de dioxinas en estudio en el embudo de decantación, se añade 1 mL de NaCl (25%, *m/v*) para favorecer la separación de fases, y 1 mL de diclorometano. Se agita vigorosamente el sistema durante 2 minutos abriendo periódicamente para su ventilación, y se retira el extracto que es introducido en un vial con cierre hermético. Este proceso se repite dos veces más de forma que el extracto final sea de 3 mL, del que se toman 20  $\mu$ L para su análisis en el cromatógrafo líquido.

#### **IV.3.7 Extracción de dibenzo-p-dioxinas policloradas y pesticidas por microondas en medio micelar**

La muestra de 2 g de sedimento o suelo, previamente acondicionada, se deposita en el vaso de extracción y se añade la disolución de surfactante a la concentración optimizada. Después de cerrados, los vasos se introducen en el microondas y se les aplica la potencia y el 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.

Con una pipeta Pasteur se recoge todo el líquido sobrenadante, el cual, después de filtrado, se inyecta en el sistema cromatográfico. El filtrado de las muestras se realiza con filtros de jeringa de la marca Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$  de poro y 25 mm de diámetro.

#### **IV.3.8 Extracción Soxhlet**

##### ***IV.3.8.1 Extracción de dibenzo-p-dioxinas policloradas***

Sobre una muestra de 10 g de sedimento previamente acondicionada, se realiza la extracción con 35 mL de tolueno al 60% (v/v) durante 24 horas a 5-6 ciclos por hora. Posteriormente se toman 20  $\mu\text{L}$  del extracto para su análisis cromatográfico.

##### ***IV.3.8.2 Extracción de pesticidas organofosforados***

Los analitos en una muestra de 2 g de suelo previamente acondicionada se extraen con 35 mL de una mezcla de acetona:n-hexano (1:1) durante 24 horas a 4-6 ciclos por hora. En este caso el extracto se lleva a sequedad utilizando un rotavapor y posteriormente se disuelve en 10 mL de metanol para inyectarlo en el sistema cromatográfico.

#### **IV.3.9 Extracción por Ultrasonidos**

##### ***IV.3.9.1 Extracción de pesticidas organofosforados***

La muestra de 2 g de piel de tomate previamente acondicionada se extrae con 60 mL de acetato de etilo, 15 gramos de sulfato sódico anhidro y 10

minutos de ultrasonidos. La fase líquida se retira y se filtra a través de un embudo con placa porosa y una capa de sulfato sódico anhidro. Se realiza una segunda extracción con 30 mL de acetato de etilo y 5 minutos de ultrasonidos. Se retira la fase líquida y se filtra de nuevo en el mismo embudo de la vez anterior. Posteriormente se lleva el extracto a sequedad casi total en un rotavapor y se finaliza la evaporación en corriente de nitrógeno. Después se suspende en un volumen de 2 mL de ciclohexano y se analiza cromatográficamente.

#### **IV.3.10 Acondicionamiento de las muestras sólidas**

##### ***IV.3.10.1 Sedimentos marinos***

A fin de obtener muestras de sedimentos marinos, procedentes de diferentes zonas de las costas canarias, lo más homogéneas posible, éstas se lavaron con agua destilada para eliminar la sal y evitar que se concentrase en la parte superior de la muestra durante el proceso de secado. Posteriormente se secaron en una estufa a 100°C, se tamizaron y se recogió la fracción correspondiente a un tamaño inferior a 0.15 mm, en el caso de los sedimentos del puerto de Taliarte y 0.30 mm en los sedimentos de Las Canteras y Fuerteventura.

Una vez secas las muestras, se pesaron 2 g de sedimento y se llevaron a unos tubos de cristal; se les añadió el volumen necesario de la mezcla de dioxinas, se agitaron y se cerraron herméticamente. Estas muestras se guardaron en la oscuridad a temperatura ambiente, y se utilizaron después de 24 horas de acondicionamiento.

### ***IV.3.10.2 Suelos***

A fin de tomar una muestra lo más homogénea posible, se procedió directamente al tamizado de las mismas, y se tomó la fracción de tamaño inferior a 0,30 mm. El acondicionamiento de estas muestras se realizó de la misma forma que el de las muestras de sedimentos marinos, poniendo en contacto las muestras con la mezcla de pesticidas, agitando bien para su mejor distribución en toda la muestra y guardándolas en la oscuridad para su posterior utilización después de 24 horas.

### **IV.3.11 Caracterización de los suelos**

#### ***IV.3.11.1 Determinación del contenido en materia orgánica***

Los métodos que se utilizan en la actualidad para la determinación de este parámetro se basan todos en la oxidación de la materia orgánica del suelo por vía húmeda con dicromato potásico y ácido sulfúrico. Por su amplitud de aplicación en las condiciones más variadas, el método de Sauerlandt fue el método utilizado para determinar el contenido de carbono en las muestras de suelo estudiadas.

Se tomó 1 gramo de tierra de San Roque (esta muestra de suelo tiene mayor contenido en materia orgánica) y 3 gramos de las restantes, después de dejarlas secar a temperatura ambiente. Después de tamizarla, la muestra de suelo 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 los tres tipos de suelo se muestran en la Tabla III.8.

#### ***IV.3.11.2 Determinación del pH***

Debido a la naturaleza sólida de la matriz, el pH del suelo es el que se obtiene potenciométricamente en la suspensión obtenida por agitación del suelo con agua. El tiempo de agitación y de decantación elegido debe ser suficiente para asegurar que el suelo en suspensión haya alcanzado el equilibrio químico con la fase líquida cuando se realice la lectura del pH. En nuestro caso utilizamos 5 g de tierra con 20 mL de agua destilada; agitamos durante 1 minuto y dejamos decantar durante media hora. Los pH medidos se muestran en la Tabla III.8.

#### ***IV.3.11.2 Determinación granulométrica***

A fin de obtener muestras lo más homogéneas posible y determinar las características de las mismas, se utilizaron tamices de diferente tamaño de poro. En primer lugar se realizó una primera selección, tomando las muestras con granulometría inferior a 300 micras. Y posteriormente se determinó el porcentaje de muestra correspondiente a las distintas granulometrías que se detallan en la Tabla III.8 a partir de una muestra homogénea y representativa de 100 gr.

## **CAPÍTULO V.- CONCLUSIONES**





De los resultados obtenidos en los diferentes estudios realizados en la presente Tesis Doctoral se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Se ha demostrado que la metodología de extracción por *punto de nube* desarrollada es un procedimiento de extracción rápido, simple, barato, ecológico y perfectamente válido para la extracción y preconcentración de dioxinas y pesticidas en muestras acuosas.
2. La adición de NaCl en la disolución permite potenciar aún más las ventajas del trabajo con surfactantes, haciendo que la temperatura a aplicar sea más baja, lo que supone además un ahorro energético, y evita la reversibilidad del proceso, ya que de esta forma las fases permanecen separadas durante más tiempo.
3. Los valores de recuperación obtenidos para los distintos analitos con cada uno de los surfactantes estudiados son bastante satisfactorios, con porcentajes de recuperación superiores al 80% en la mayoría de los casos. De igual forma, los factores de preconcentración son superiores a 10, excepto en aquellos casos en los que se aplica un factor de preconcentración inferior para evitar interferencias.

4. Se ha demostrado la extensa aplicabilidad del método desarrollado, siendo igual de eficiente a la hora de extraer y preconcentrar los analitos bajo estudio, en muestras de diferente contenido salino (agua de mar, agua potable, agua salobre) y de diferente procedencia (agua de riego, agua depurada). Lo que evidencia que el mismo no se ve influenciado por las características fisicoquímicas de la matriz.

5. A partir de todos los aspectos mencionados, cabe concluir que la metodología de extracción por punto de nube es una alternativa real a otras técnicas de extracción que se emplean de forma tradicional, que podría ser utilizada en laboratorios de rutina y que posee una serie de ventajas que la hacen muy competitiva y muy conveniente, sobre todo bajo una filosofía de trabajo más sensibilizada con el medioambiente.

6. Se ha desarrollado un método de extracción en matrices sólidas mediante la extracción micelar asistida por microondas. Los resultados obtenidos muestran que los surfactantes estudiados son muy eficaces, siendo aparentemente más adecuado el POLE para la extracción de pesticidas organofosforados, tanto en matrices biológicas (tomates) como geológicas (suelos), y el Genapol X-080 para la extracción de PCDDs. El POLE al tener un mayor número de cadenas oxietilencias presenta una mayor polaridad que el Genapol X-080, lo que le haría más afín a los pesticidas organofosforados (algo más polares) que las dioxinas (fuertemente apolares).

7. Se ha encontrado que los parámetros más determinantes en la extracción micelar asistida por microondas en matrices sólidas son el tiempo y la potencia de radiación.

8. Otro aspecto interesante que se deduce del trabajo con matrices sólidas es la fuerte influencia de las características de la matriz en el proceso de extracción. Estas características van a condicionar, por una parte, la interacción de la misma con el analito y por tanto su mayor o menor facilidad para su extracción, y por otra, las condiciones experimentales del proceso. De los resultados obtenidos en nuestro estudio se deduce que las muestras biológicas necesitan condiciones menos enérgicas de extracción que los suelos y sedimentos.

9. El estudio de la eficiencia de extracción del método propuesto y la influencia de la interacción con la matriz en el tiempo, ponen de manifiesto que si bien los resultados son muy satisfactorios después de 24 horas de contacto, los porcentajes de recuperación que se obtienen cuando transcurre mayor tiempo disminuyen de forma considerable. Este efecto de disminución de la recuperación con el “envejecimiento” de la muestra revela que es un factor muy importante a tener en cuenta a la hora de aplicar el método a muestras reales de las que se desconoce el tiempo de contacto.

10. Para validar el método de extracción de los distintos compuestos se emplearon técnicas de extracción tradicionales como la extracción Soxhlet (para las matrices de sedimentos y suelos) y la extracción por Ultrasonidos (para las matrices de piel de tomate). En todos los casos los resultados obtenidos mostraron recuperaciones bastante similares a las del método propuesto para todos los analitos en estudio.

11. Se ha demostrado que la metodología de extracción micelar asistida por microondas es un procedimiento de extracción perfectamente válido para la extracción de dioxinas y pesticidas en muestras sólidas, que además de las ventajas debidas a la utilización del sistema de extracción

basado en el uso de las microondas, incorpora las ventajas debidas al uso de surfactantes como extractantes. Resultando en un procedimiento de extracción muy rápido, eficiente, económico, ecológico y que permite la "semi-automatización" del proceso (12 extracciones simultáneas). Por todo ello, constituye una alternativa real a otras técnicas de extracción que se emplean de forma tradicional y podría ser utilizado en laboratorios de rutina.

## ESTUDIOS FUTUROS

El único aspecto mejorable de estas metodologías basadas en la utilización de medios micelares como extractantes sería su acoplamiento a sistemas de detección más sensibles debido a las exigencias del análisis de ciertos contaminantes cuya concentración en el medio es extraordinariamente baja (p.e. las dioxinas). Por lo que en estudios futuros se podría tratar de analizar estos extractos en un sistema LC/MS (que no precisaría de un pretratamiento del extracto ya que los medios micelares son perfectamente compatibles con la fase móvil hidroalcohólica de los sistemas HPLC), o buscar una manera viable para su adaptación al análisis en un sistema GC/MS.

A modo de ensayo, se ha tratado de realizar ese acoplamiento a un sistema GC/MS mediante la utilización de un sistema de microextracción en fase sólida como paso intermedio. Este proceso permitiría la extracción y preconcentración de los analitos presentes en una disolución acuosa en un soporte sólido, que posteriormente se introduce en el GC/MS donde se produce la desorción térmica de los mismos. Los resultados previos en esta línea son prometedores y constituyen el primer paso de una nueva línea de investigación de nuestro Grupo.

# **ANEXO I.- CROMATOGRFÍA**



## 1. Introducción

Para optimizar la separación de los compuestos en estudio de manera que se permita una correcta identificación y su posterior cuantificación es necesaria la determinación de los parámetros exclusivamente cromatográficos: tipo de columna cromatográfica, composición de fase móvil, velocidad de flujo (mL/min), aplicación o no de gradientes de composición y/o velocidad de flujo, temperatura y pH. En este caso puesto que las familias de compuestos con que se ha trabajado son fundamentalmente apolares se optó por trabajar en cromatografía en fase reversa, por lo que se escogió una columna C18 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, inicialmente se partió de una fase móvil de metanol:agua (85:15) con un flujo de  $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , aunque la proporción de los dos componentes se ha variado junto con la aplicación o no de gradientes, a fin de separar los compuestos en un tiempo de análisis razonable. A continuación se muestran las condiciones más para la correcta separación y detección de las distintas familias de compuestos estudiados.

## 2. Condiciones cromatográficas para la determinación de dibenzo-p-dioxinas

### 2.1 Determinación de dibenzo-p-dioxinas en matrices acuosas

La separación y determinación de dioxinas policloradas se llevó a cabo mediante la inyección directa de 20  $\mu$ L de una disolución de las mismas en el sistema HPLC/UV bajo las siguientes condiciones cromatográficas: fase móvil compuesta por metanol:agua Milli-Q (90:10) y velocidad de flujo: 1 mL/min hasta los 14 min., y de 1.5 mL/min desde los 14 a los 35 min. En la Figura A.1 se muestra el cromatograma representativo de una disolución de las dioxinas en estudio en presencia de POLE y Genapol X-080 donde se observa una adecuada separación de los analitos en estudio, en un tiempo razonable de análisis. En la Tabla A.1 se observan los tiempos de retención obtenidos para cada dioxina y la longitud de onda empleada para el análisis de las mismas, obtenidos a partir de la inyección de varias réplicas (n=5) y calculando la media para cada uno de ellos. La variación de estos tiempos, en función del medio micelar utilizado no es significativa.

#### Análisis de extractos LLE

En este caso, como el disolvente de los extractos a analizar era el diclorometano, y su miscibilidad con la fase móvil de metanol:agua Milli-Q (90:10) empleada para los extractos CPE no es la más adecuada, se decidió emplear una fase móvil de metanol:agua Milli-Q:acetonitrilo (80:10:10) y velocidad de flujo de 1 mL/min hasta los 14 min., y de 1.5 mL/min desde los 14 a los 35 min, a fin de mejorar la detección de los compuestos. En la Figura A.2 se muestra la separación de los compuestos empleando esta fase móvil y en la Tabla A.2 los tiempos de retención obtenidos para cada dioxina y longitud de onda empleada para el análisis de las mismas.



**Figura A.1.-** Cromatogramas de la mezcla de dioxinas bajo estudio en presencia de los surfactantes POLE y Genapol X-080.

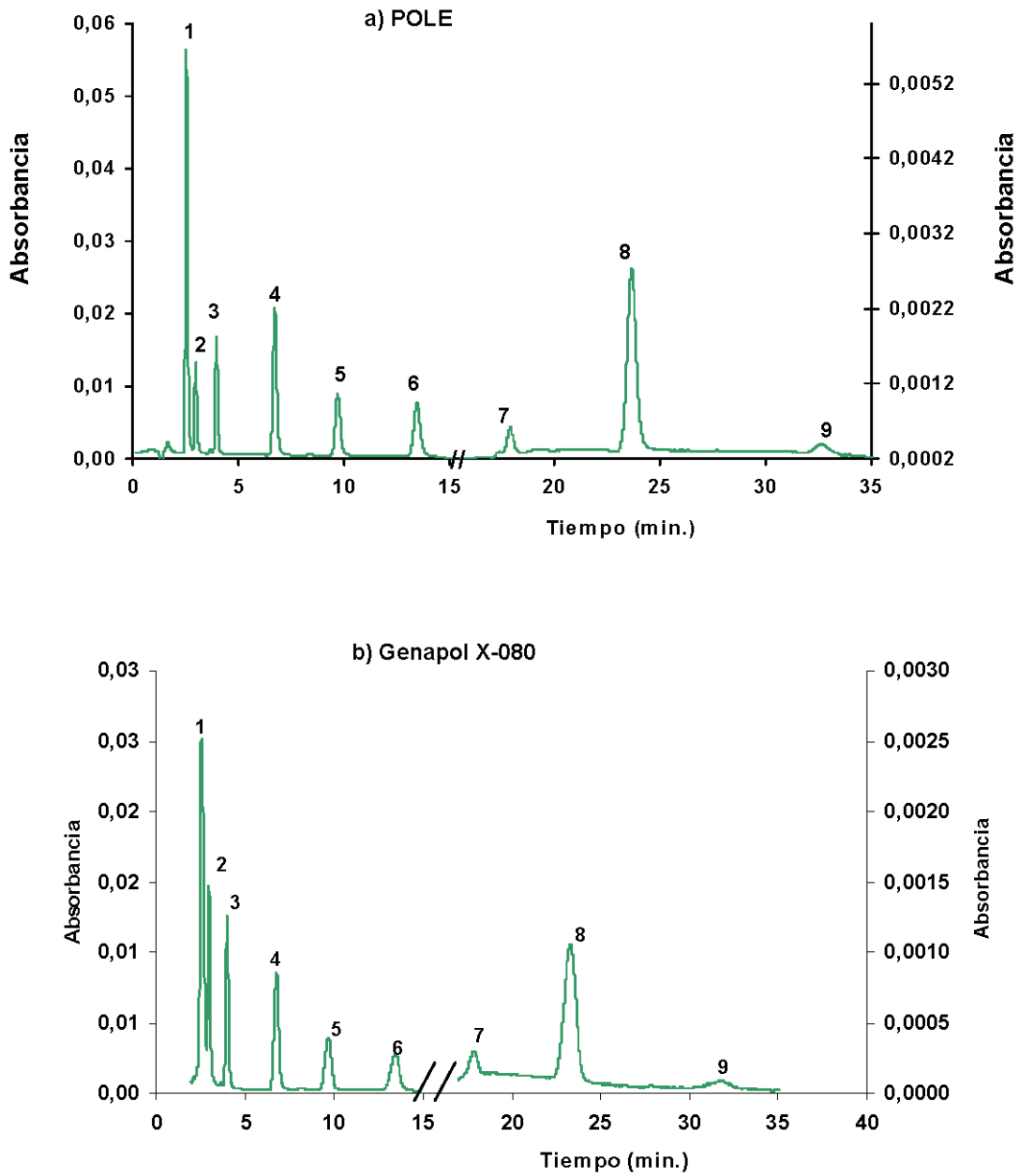


Tabla A.1.- Tiempos de retención y longitudes de onda empleadas en el análisis de PCDDs en muestras acuosas (CPE)

Compuesto	Número Identificativo	t <sub>r</sub> (min)	λ UV-Vis (nm)
Dibenzo-p-dioxina	1	2.5	232
1-Clorodibenzo-p-dioxina	2	3.0	232
2,3-Diclorodibenzo-p-dioxina	3	4.0	232
2,3,7-Triclorodibenzo-p-dioxina	4	6.9	232
2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-p-dioxina	5	10.1	232
1,2,3,7,8- Pentaclorodibenzo-p-dioxina	6	14.0	232
1,2,3,6,7,8-Hexaclorodibenzo-p-dioxina	7	18.5	232
1,2,3,4,6,7,8-Heptaclorodibenzo-p-dioxina	8	24.4	232
1,2,3,4,6,7,8,9-Octaclorodibenzo-p-dioxina	9	33.7	232

Figura A.2.- Cromatograma de la mezcla de dioxinas en estudio en las condiciones cromatográficas empleadas bajo la metodología LLE.

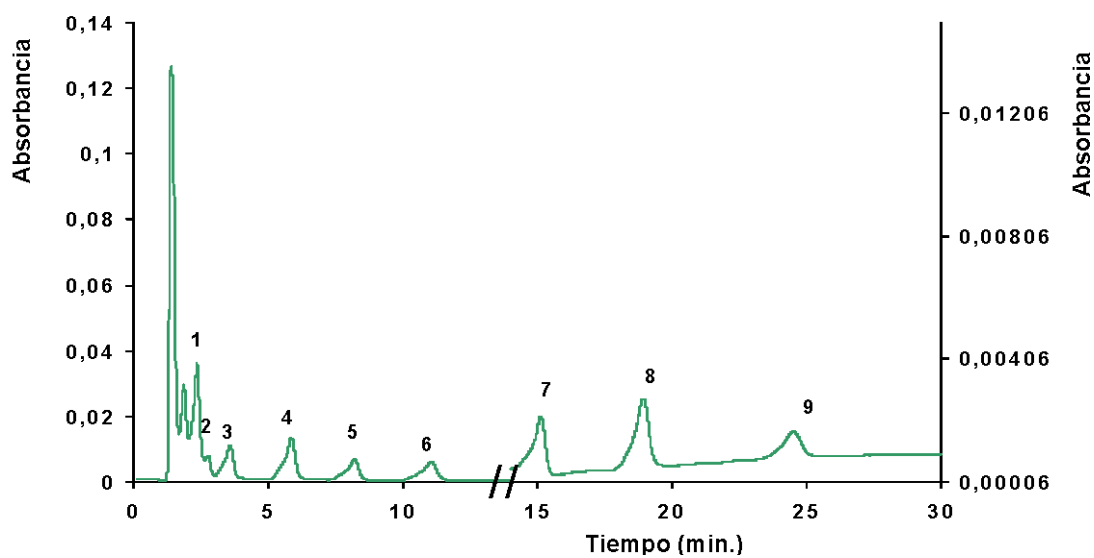


Tabla A.2.- Tiempos de retención y longitudes de onda empleadas en el análisis de PCDDs en muestras acuosas (LLE)

Compuesto	Número Identificativo	t <sub>r</sub> (min)	λ UV-Vis (nm)
Dibenzo-p-dioxin	1	2.5	232
1-Chlorodibenzo-p-dioxin	2	3.0	232
2,3-Dichlorodibenzo-p-dioxin	3	3.5	232
2,3,7-Trichlorodibenzo-p-dioxin	4	6.4	232
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin	5	8.3	232
1,2,3,7,8- Pentachlorodibenzo-p-dioxin	6	11.6	232
1,2,3,6,7,8-Hexachlorodibenzo-p-dioxin	7	15.1	232
1,2,3,4,6,7,8-Heptachlorodibenzo-p-dioxin	8	19.4	232
1,2,3,4,6,7,8,9-Octachlorodibenzo-p-dioxin	9	24.9	232

### **2.1.1 Curvas de calibrado empleadas en la determinación de dibenzo-p-dioxinas en matrices acuosas**

Para la cuantificación de los compuestos en estudio, presentes en los extractos de las diferentes muestras con que se ha trabajado, se establecieron curvas de calibrado para cada analito en cada uno de los surfactantes utilizados. Debido a que tanto las dibenzo-p-dioxinas como los pesticidas organofosforados 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.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.

**Tabla A.3.-** Parámetros de las curvas de calibrado obtenidas para las dibenzo-p-dioxinas en los diferentes extractantes en las condiciones cromatográficas establecidas para el análisis de muestras acuosas.

Compuesto	POLE			Genapol X-080			Diclorometano		
	L.D.R. <sup>a</sup> (ng.mL <sup>-1</sup> )	A <sup>b</sup>	B <sup>c</sup>	L.D.R. <sup>a</sup> (ng.mL <sup>-1</sup> )	A <sup>b</sup>	B <sup>c</sup>	L.D.R. <sup>a</sup> (ng.mL <sup>-1</sup> )	A <sup>b</sup>	B <sup>c</sup>
DD	100-600	140.6	-5541.6	--- <sup>d</sup>	--- <sup>d</sup>	--- <sup>d</sup>	600-1600	376.0	-16958
1DD	100-600	320.9	-6118	25-2000	239.9	11266	600-1600	101.3	-48186
2DD	10-500	173.4	-1686.9	25-2000	247.2	-1170	600-1600	155.9	-5384.9
3DD	10-500	274.0	2412.8	10-2000	360.7	-4530.4	600-1600	229.7	2157.5
4DD	10-500	197.9	-181.1	10-2000	205.1	-2128	600-1600	165.8	-25350
5DD	10-500	164.3	-267.7	10-2000	183.1	-2125.5	600-1600	143.7	-1004.3
6DD	200-800	5.1	-496.0	100-2000	5.9	1362.7	600-1600	19.8	-8630.3
7DD	10-500	63.7	-424.0	10-2000	83.3	159.7	600-1600	50.9	-206.8
8DD	600-1600	5.3	-1737.2	100-2000	5.4	739.6	600-1600	10.2	142.2

<sup>a</sup> Rango lineal de concentración

<sup>b</sup> Pendiente

<sup>c</sup> Ordenada en el origen

<sup>d</sup> Interferencia con surfactante

## 2.2 Determinación de dibenzo-p-dioxinas en matrices sólidas

En el caso de las matrices sólidas se modificaron las condiciones cromatográficas a fin de optimizar la detección y evitar las posibles interferencias debidas al trabajo con longitudes de onda tan bajas (232 nm). En este caso, se aplicó un gradiente a la fase móvil con un mayor contenido de agua al inicio, a fin de retrasar los tiempos de retención de los compuestos y evitar interferencias con el surfactante, y se aplicaron longitudes de onda más específicas para cada compuesto. De esta forma el análisis de las dioxinas se llevó a cabo mediante la inyección de 20 µL de los

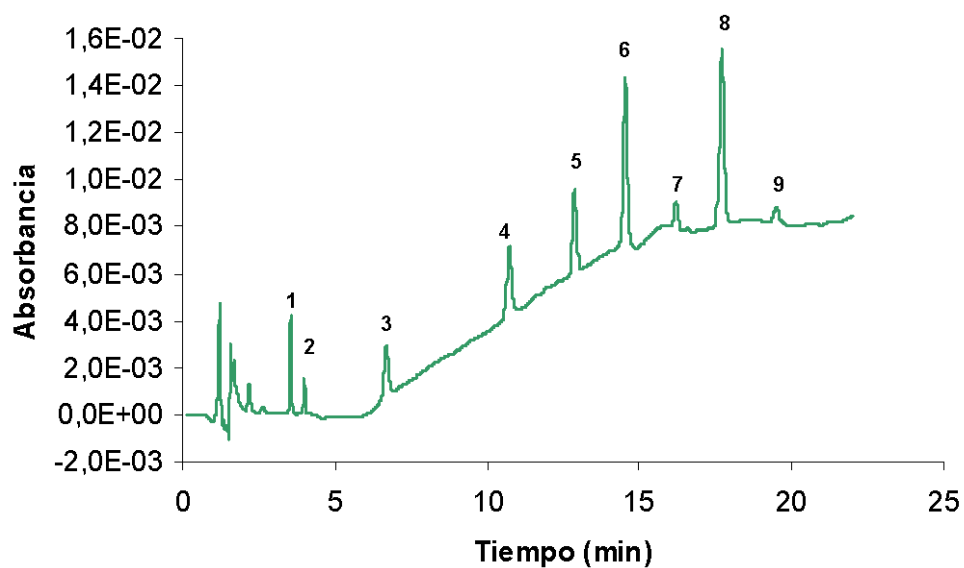
extractos obtenidos, sin otro tratamiento posterior de la muestra excepto la filtración, en el sistema HPLC/UV.

Las condiciones cromatográficas empleadas fueron una fase móvil de metanol: agua Milli-Q (85:15) hasta los 3 minutos, después gradiente a 100:0 (metanol:agua) hasta los 13 minutos seguido de isocrático en 100:0 (metanol:agua) hasta el final del análisis (20 minutos), todo ello a una velocidad de flujo constante de 1 mL/min. En la Figura A.3 se muestra el cromatograma obtenido bajo esta fase móvil donde puede apreciarse una adecuada separación de los analitos en estudio en un tiempo razonable de análisis. La Tabla A.4 recoge los tiempos de retención obtenidos y las longitudes de onda empleadas en cada caso. Los tiempos de retención mostrados son los valores medios obtenidos después de realizar varias inyecciones (n=5) de las muestras.

#### Análisis de extractos Soxhlet

Las condiciones empleadas en este caso para la determinación cromatográfica de las dioxinas fueron las mismas que para los extractos MAME ya que los extractos eran perfectamente miscibles en la fase móvil empleada. 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.

**Figura A3.-** Cromatograma de la mezcla de PCDDs en Genapol X-080 (5%, v/v) aplicando las condiciones cromatográficas optimizadas.



**Tabla A.4.-** Tiempos de retención y longitudes de onda empleadas en el análisis de PCDDs en muestras sólidas.

Compuesto	Número Identificativo	$t_r$ (min)	$\lambda$ UV-Vis (nm)
Dibenzo-p-dioxin	1	3.6	224
1-Chlorodibenzo-p-dioxin	2	4.5	228
2,3-Dichlorodibenzo-p-dioxin	3	6.9	228
2,3,7-Trichlorodibenzo-p-dioxin	4	11.1	232
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin	5	12.9	232
1,2,3,7,8- Pentachlorodibenzo-p-dioxin	6	14.9	240
1,2,3,6,7,8-Hexachlorodibenzo-p-dioxin	7	16.0	240
1,2,3,4,6,7,8-Heptachlorodibenzo-p-dioxin	8	18.3	246
1,2,3,4,6,7,8,9-Octachlorodibenzo-p-dioxin	9	19.7	246

### 2.2.1 Curvas de calibrado empleadas en la determinación de dibenzo-p-dioxinas en matrices sólidas

Para la cuantificación de los compuestos en estudio, presentes en los extractos de las diferentes muestras con que se ha trabajado, se establecieron curvas de calibrado para cada analito en cada uno de los surfactantes utilizados.

A continuación, 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.

**Tabla A.5.-** Parámetros de las curvas de calibrado obtenidas para las dibenzo-p-dioxinas en los distintos extractantes bajo las condiciones cromatográficas empleadas en la extracción de muestras sólidas.

Compuesto	POLE			Genapol X-080			Tolueno		
	L.D.R. <sup>a</sup> (ng.mL <sup>-1</sup> )	A <sup>b</sup>	B <sup>c</sup>	L.D.R. <sup>a</sup> (ng.mL <sup>-1</sup> )	A <sup>b</sup>	B <sup>c</sup>	L.D.R. <sup>a</sup> (ng.mL <sup>-1</sup> )	A <sup>b</sup>	B <sup>c</sup>
DD	10-500	350.1	-5058.8	50-500	343.7	9619.1	50-500	73.4	-3367.1
1DD	50-500	301.0	-6900.4	50-500	259.2	11376	50-500	239.9	11266
2DD	10-500	197.3	792.9	10-500	163.7	-668.9	50-500	247.2	-1170
3DD	10-500	245.3	-224.1	10-500	233.6	-780.5	25-500	360.7	-4530.4
4DD	10-500	168.9	-1368.9	10-500	155.3	-875.9	25-500	205.1	-2128
5DD	10-500	148.6	-323.2	10-500	141.5	-779.2	25-500	183.1	-2125.5
6DD	20-500	13.3	-118.6	25-500	18.6	359.8	200-900	38.2	-5264.7
7DD	10-500	176.0	-610.4	10-500	152.5	474.7	300-800	83.3	159.7
8DD	50-500	8.9	-80.6	25-500	31.9	-32.4	300-1100	23.2	-1932.5

<sup>a</sup> Rango lineal de concentración

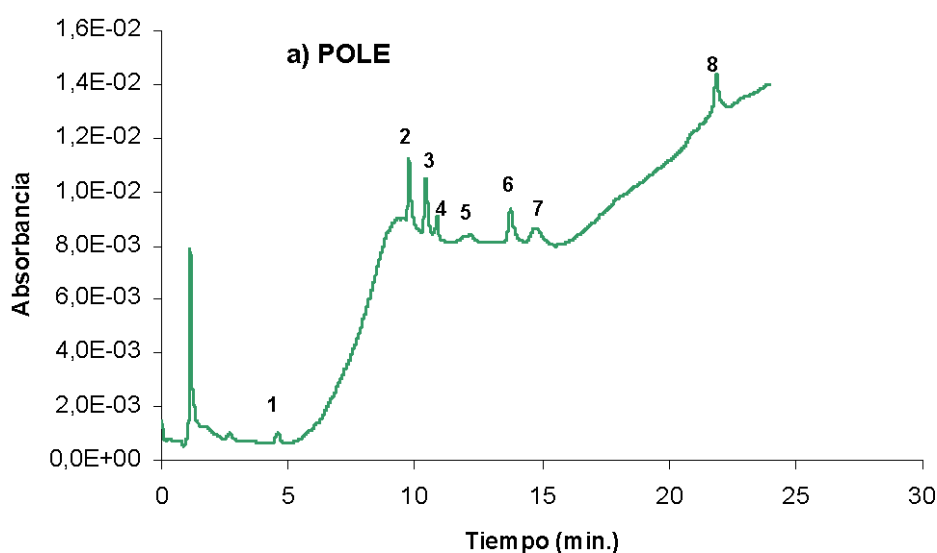
<sup>b</sup> Pendiente

<sup>c</sup> Ordenada en el origen

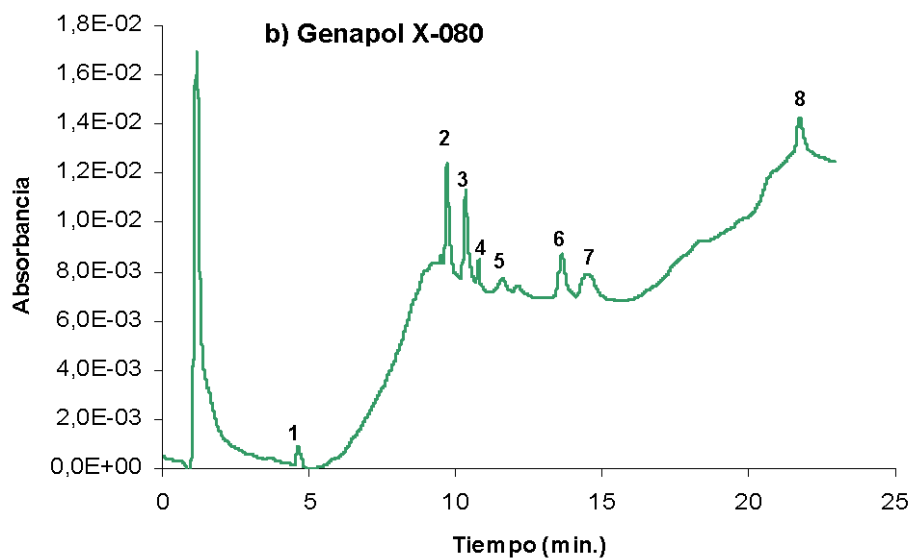
### 3. Condiciones cromatográficas para la determinación de pesticidas organofosforados

En este caso, las condiciones establecidas para el análisis se mantuvieron para todos los extractos, tanto de muestras líquidas como sólidas y bajo las diferentes metodologías aplicadas. De forma que la separación e identificación de los pesticidas fue realizada mediante la inyección directa de 20  $\mu\text{L}$  de los extractos obtenidos en el sistema HPLC/UV bajo las siguientes condiciones cromatográficas: fase móvil de metanol:agua Milli-Q (35:65) durante 2 minutos, después gradiente hasta los 6 minutos a metanol: agua Milli-Q (70:30), isocrático hasta los 13 minutos y por último gradiente hasta los 25 minutos a metanol: agua Milli-Q (99:1). Durante todo el análisis se mantuvo una velocidad de flujo constante de 1 mL/min. En la Figura A.4 se muestra el cromatograma representativo de una disolución de pesticidas organofosforados en estudio en presencia de POLE y Genapol X-080 donde se observa una adecuada separación de los analitos en estudio. Los tiempos de retención obtenidos y las longitudes de onda empleadas para la determinación de cada compuesto se muestran en la Tabla A.6.

Figura A.4.- Cromatogramas de la mezcla de pesticidas organofosforados en estudio en presencia de los surfactantes POLE y Genapol X-080.







**Tabla A.6.-** Tiempos de retención y longitudes de onda empleadas en el análisis de pesticidas organofosforados.

Compuesto	Número Identificativo	$t_r$ (min)	$\lambda$ UV-Vis (nm)
Dimetoato	1	4.5	205
Metidación	2	9.6	215
Paratión metil	3	10.2	271
Malatión	4	10.7	215
Etoprofos	5	11.9	228
Paratión etil	6	13.2	276
Diazinón	7	14.3	247
Clorpirifos	8	21.2	228

### 3.1.1 Curvas de calibrado empleadas en la determinación de pesticidas organofosforados

Para la cuantificación de los pesticidas organofosforados se establecieron curvas de calibrado para cada analito en cada uno de los surfactantes utilizados, con independencia del tipo de matriz estudiado.

A continuación, 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.

Tabla A.7.- Parámetros de las curvas de calibrado obtenidas para los pesticidas organofosforados en los distintos surfactantes bajo las condiciones cromatográficas empleadas en la extracción en las diferentes muestras.

Compuesto	POLE			Genapol X-080		
	L.D.R. <sup>a</sup> (ng.mL <sup>-1</sup> )	A <sup>b</sup>	B <sup>c</sup>	L.D.R. <sup>a</sup> (ng.mL <sup>-1</sup> )	A <sup>b</sup>	B <sup>c</sup>
Dimetoato	50-3000	42.8	212.8	25-2500	47.1	-542.2
Metidación	50-3000	52.1	223.1	25-2500	53.7	1651.8
Paratión-m	50-3000	28.8	752.4	25-2500	30.9	53.7
Malatión	300-3000	17.5	-3074.4	100-2500	18.6	-509.0
Etoprofos	500-3000	4.7	-678.7	250-2500	4.8	-169.2
Paratión-e	50-3000	45.5	-863.9	25-2500	47.1	517.3
Diazinón	50-3000	19.5	-1007.2	25-2500	19.3	-79.3
Clorpirifos	100-3000	44.3	-1281.5	50-2500	45.0	-1495.4

<sup>a</sup> Rango lineal de concentración

<sup>b</sup> Pendiente

<sup>c</sup> Ordenada en el origen

## **ANEXO II.- PUBLICACIONES Y** **COMUNICACIONES**



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

### Publicaciones

- Extraction and preconcentration of PCDDs using cloud-point methodology. Application to their determination in water samples by High Performance Liquid Chromatography.  
C. Padrón Sanz, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodríguez  
Analytica Chimica Acta 470 (2002) 205
- Extraction of PCDDs from marine sediments using Polyoxyethylene 10 Lauryl Ether and Oligoethylen Glycol Monoalkyl Ether surfactants.  
C. Padrón Sanz, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodríguez  
Analytical Letters 37 (2004) 1
- Micellar extraction of organophosphorous pesticides and their determination by High Performance Liquid Chromatography.  
C. Padrón Sanz, R. Halko, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodríguez  
Analytica Chimica Acta 524 (2004) 265
- Combination of Microwave Assisted Micellar Extraction and Liquid Chromatography to the determination of organophosphorous pesticides in soil samples.

C. Padrón Sanz, R. Halko, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodríguez  
Journal of Chromatography A 1078 (2005) 13

- An approach to the application of Microwave Assisted Micellar Extraction and HPLC-UV to the extraction and determination of organophosphorous pesticides in tomato samples.  
C. Padrón Sanz, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodríguez  
Journal of AOAC International (aceptado)

### Comunicaciones

- Comunicación Oral: High Performance Liquid Chromatography determination of organochlorinated compounds in marine organisms using micellar systems.  
C. Padrón, Z. Sosa and J.J. Santana  
25<sup>th</sup> International Symposium on High Performance Liquid Phase, Separations and Related Techniques.  
Maastrich (Holanda), Junio 2001.
- Comunicación Póster: High Performance Liquid Chromatography determination of organochlorinated compounds in marine organisms using micellar systems.  
C. Padrón, Z. Sosa and J.J. Santana  
25<sup>th</sup> International Symposium on High Performance Liquid Phase, Separations and Related Techniques.  
Maastrich (Holanda), Junio 2001.
- Comunicación Póster: Determination of PCDDs in water systems using cloud point methodology and HPLC detection.

C. Padrón, Z. Sosa and J.J. Santana

I Reunión Nacional sobre Dioxinas, Furanos y Compuestos Orgánicos Persistentes Relacionados.

Madrid (España), Octubre 2001.

- Comunicación Póster: A new analytical method based on Microwave Assisted Micellar Extraction and HPLC-UV detection for the determination of PCDDs in marine sediments.

C. Padrón, Z. Sosa and J.J. Santana

VII International Symposium on Analytical Methodology in the Environmental Field.

Valladolid (España), Marzo 2002.

- Comunicación Póster: Extraction and determination of PCDDs in marine sediments using Microwave Assisted Micellar Extraction and High Performance Liquid Chromatography.

C. Padrón, Z. Sosa and J.J. Santana

XII Euroanalysis.

Dortmund (Alemania), Septiembre 2002.

- Comunicación Oral: Use of Genapol X-080 on the extraction of dibenzo-p-dioxins from marine sediment samples and their determination by High Performance Liquid Chromatography.

C. Padrón, Z. Sosa and J.J. Santana

10ª Jornadas de Análisis Instrumental.

Barcelona (España), Noviembre 2002.

- Comunicación Póster: Extraction and determination of PCDDs in marine sediments using Microwave Assisted Micellar Extraction and High Performance Liquid Chromatography.

C. Padrón, Z. Sosa and J.J. Santana

XII Euroanalysis.

Dortmund (Alemania), Septiembre 2002.

- Comunicación Póster: The micellar systems: An alternative to the organic solvents to the extraction and preconcentration of organic pollutants in environmental samples.

C. Padrón, C. Mahugo, Z. Sosa and J.J. Santana

4<sup>th</sup> Chemical Industry and Environment. EMChIE2003.

Las Palmas de Gran Canaria (España), Febrero 2003.

- Comunicación Póster: Comparison of two non-ionic surfactants applied to the extraction and preconcentration of PCDDs in marine sediments using HPLC-UV detection.

C. Padrón, Z. Sosa and J.J. Santana

HPLC 2003.

Niza (Francia), Junio 2003.

- Comunicación Póster: Micellar extraction of organophosphorous pesticides and their determination by High Performance Liquid Chromatography.

C. Padrón, Z. Sosa and J.J. Santana

XIII Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica. VIII International Symposium on Analytical Methodology in the Environmental Field.

A Coruña (España), Octubre 2003.

- Comunicación Póster: Microwave Assisted Micellar Extraction and HPLC determination of pesticides in soil samples.

C. Padrón, Z. Sosa and J.J. Santana



4<sup>th</sup> European Meeting on Environmental Chemistry.  
Plymouth (Inglaterra), Diciembre 2003.

- Comunicación Póster: Comparison of two Microwave Assisted Micellar Extraction methodologies for the analysis of organophosphorous pesticides and HPLC/UV detection.  
C. Padrón, R. Halko, Z. Sosa and J.J. Santana  
12<sup>th</sup> International Symposium. Advances and Applications of Chromatography in Industry.  
Bratislava (Eslovaquia), Junio 2004.
- Comunicación Póster: Analysis of PCDDs from marine sediments under a green extraction method and GC/MS.  
C. Padrón, Juan J. Santana, Z. Sosa, José J. Santana and J.E. González  
XIII Euroanalysis.  
Salamanca (España), Septiembre 2004.
- Comunicación Póster: Analysis of organophosphorous pesticides in tomatoes by Microwave Micellar Extraction and HPLC-PDA UV detection.  
C. Padrón, Z. Sosa and J.J. Santana  
5<sup>th</sup> European Meeting on Environmental Chemistry.  
Bari (Italia), Diciembre 2004.



**EXTRACTION AND PRECONCENTRATION OF PCDDS USING CLOUD-  
POINT METHODOLOGY. APPLICATION TO THEIR DETERMINATION IN  
WATER SAMPLES BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY**

C. PADRÓN SANZ, Z. SOSA FERRERA, J.J. SANTANA RODRÍGUEZ  
ANALYTICA CHIMICA ACTA 470 (2002) 205



**EXTRACTION OF PCDDS FROM MARINE SEDIMENTS USING  
POLYOXYETHYLENE 10 LAURYL ETHER AND OLIGOETHYLEN GLYCOL  
MONOALKYL ETHER SURFACTANTS.**

**C. PADRÓN SANZ, Z. SOSA FERRERA, J.J. SANTANA RODRÍGUEZ  
ANALYTICAL LETTERS 37 (2004) 1**



**MICELLAR EXTRACTION OF ORGANOPHOSPHOROUS PESTICIDES AND  
THEIR DETERMINATION BY HIGH PERFORMANCE LIQUID  
CHROMATOGRAPHY.**

**C. PADRÓN SANZ, R. HALKO, Z. SOSA FERRERA, J.J. SANTANA  
RODRÍGUEZ**

**ANALYTICA CHIMICA ACTA 524 (2004) 265**





**COMBINATION OF MICROWAVE ASSISTED MICELLAR EXTRACTION AND  
LIQUID CHROMATOGRAPHY TO THE DETERMINATION OF  
ORGANOPHOSPHOROUS PESTICIDES IN SOIL SAMPLES.**

C. PADRÓN SANZ, R. HALKO, Z. SOSA FERRERA, J.J. SANTANA  
RODRÍGUEZ

JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A 1078 (2005) 13



**AN APPROACH TO THE APPLICATION OF MICROWAVE ASSISTED  
MICELLAR EXTRACTION AND HPLC-UV TO THE EXTRACTION AND  
DETERMINATION OF ORGANOPHOSPHOROUS PESTICIDES IN TOMATO  
SAMPLES.**

**C. PADRÓN SANZ, Z. SOSA FERRERA, J.J. SANTANA RODRÍGUEZ  
JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL (ACEPTADO)**

