

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA Departamento de Química

TESIS DOCTORAL

ESTUDIO Y DESARROLLO DE NUEVAS METODOLOGÍAS ANALÍTICAS BASADAS EN LA UTILIZACIÓN DE MEDIOS MICELARES PARA LA EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE DERIVADOS FENÓLICOS EN MUESTRAS DE INTERÉS MEDIOAMBIENTAL

> CRISTINA MAHUGO SANTANA 2004

	U.L.P.G.C.	
	Ciencias Básicas Biblioteca	
Nº		

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

HACEN CONSTAR:

Que la presente Memoria titulada "ESTUDIO Y DESARROLLO DE NUEVAS METODOLOGÍAS ANALÍTICAS BASADAS EN LA UTILIZACIÓN DE MEDIOS MICELARES PARA LA EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE DERIVADOS FENÓLICOS EN MUESTRAS DE INTERÉS MEDIOAMBIENTAL", que presenta la Lcda. Dña. Cristina Mahugo Santana para optar al grado de Doctora en Química por esta Universidad, ha sido realizada en los laboratorios del Departamento de Química de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria bajo nuestra dirección, autorizando con esta fecha su presentación y defensa.

Y para que así conste a los efectos oportunos, en Las Palmas de Gran Canaria a 15 de Septiembre de 2004

Fdo.: José Juan Santana Rodríguez

Fdo.: Zoraida Sosa Ferrera



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

CERTIFICA:

Que la presente Memoria titulada "ESTUDIO Y DESARROLLO DE NUEVAS METODOLOGÍAS ANALÍTICAS BASADAS EN LA UTILIZACIÓN DE MEDIOS MICELARES PARA LA EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE DERIVADOS FENÓLICOS EN MUESTRAS DE INTERÉS MEDIOAMBIENTAL", que presenta la Lcda. Dña. Cristina Mahugo Santana para optar al grado de Doctora en Química por esta Universidad, ha sido realizada en los laboratorios del Departamento de Química de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Tras su registro y trámite autorizados por el Departamento, autorizo con esta fecha su presentación.

Y para que así conste, firmo el presente certificado en Las Palmas de Gran Canaria a 17 de Septiembre de 2004. En estas líneas me gustaría dar las gracias a las personas y entidades que han hecho posible la realización de esta Tesis.

En primer lugar quiero expresar mi agradecimiento a los directores de este trabajo, el Dr. José Juan Santana Rodríguez y la Dra. Zoraida Sosa Ferrera, por el gran interés que han demostrado y por la inestimable ayuda que me han prestado en todo momento.

Asimismo, me gustaría agradecer a Miguel Díaz Mederos su valiosa ayuda en la realización de este trabajo.

Mi agradecimiento a mis compañeras de laboratorio, la Dra. Juani Betancort, Daura Vega Moreno y, especialmente, a Carolina Padrón Sanz, por su ayuda y apoyo durante estos años. Gracias por los momentos que hemos pasado juntas.

También me gustaría dar la gracias al Gobierno Autónomo de Canarias (Proyecto de investigación Nº PI2000/045) y al Ministerio de Ciencia y Tecnología (Plan Nacional I+D+I Nº PPQ2002/04683).

Finalmente, quiero agradecer a mi familia y a mis amigos su comprensión y apoyo a lo largo de estos años.

ÍNDICE

CAPITULO I: INTRODUCCIÓN	1
I.1. Fenoles	3
I.2. Surfactantes	23
I.3. Objetivos	37
I.3. Bibliografía	40
CAPITULO II: EXTRACCIÓN EN MUESTRAS LÍQUIDAS	49
II.1. Introducción	51
II.1.1. Temperatura de punto de nube o cloud point	53
II.1.2. Relación de fases	57
II.1.3. Solubilización de solutos	59
II.1.4. Aplicaciones analíticas	62
II.2. Resultados y discusión	64
II.2.1. Caracterización de los surfactantes	64
II.2.1.1. Concentración micelar crítica	65
II.2.1.2. Temperatura crítica	66
II.2.1.3. Relación de fases	68
II.2.2. Optimización de la extracción por punto de nube	71
II.2.2.1. Tiempo de equilibración	72
II.2.2.2. Naturaleza del surfactante	75
II.2.2.3. Concentración de surfactante	76
II.2.2.4. pH de la disolución	78
II.2.2.5. Fuerza iónica	81

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

II.2.3. Parámetros analíticos y validación del	
método	84
II.2.4. Aplicaciones en muestras reales	92
II.3. Bibliografía	98
CAPITULO III: EXTRACCIÓN EN MUESTRAS SÓLIDAS	103
III.1. Introducción	105
III.1.1. Naturaleza de los extractantes	110
III.1.2. Volumen de extractante	112
III.1.3. Temperatura	112
III.1.4. Potencia	114
III.1.5. Tiempo de extracción	114
III.1.6. Naturaleza de la matriz	115
III.1.7. Aplicaciones de la extracción asistida por microondas	118
III.1.8. Extracción asistida por microondas utilizando surfactantes	120
III.2. Resultados y discusión	123
III.2.1. Sedimentos marinos	124
III.2.1.1. Optimización del proceso de extracción por microondas con medios micelares en sedimentos marinos	124
III.2.1.1.1. Efecto del volumen de surfactante	124
III.2.1.1.2. Efecto de la concentración de	
surfactante	125
III.2.1.1.3. Tiempo y potencia de irradiación	127

136	III.2.1.1.4. Efecto del pH
136	III.2.1.2 Parámetros analíticos y validación del método
142	III.2.1.3. Aplicación del proceso de extracción por microondas con medios micelares a muestras de sedimentos marinos
146	III.2.1.3.1. Aplicación del proceso MAME a muestras de sedimentos marinos envejecidas
148	III.2.2. Suelos
148	III.2.2.1. Optimización del proceso de extracción por microondas con medios micelares en muestras de suelos
149	III.2.2.1.1. Efecto del volumen de surfactante
150	III.2.2.1.2. Tiempo y potencia de irradiación
159	III.2.2.1.3. Influencia del pH
159	III.2.1.1.4. Influencia de la concentración de analito en la muestra
159	III.2.2.2 Parámetros analíticos y validación del método
163	III.2.2.3. Aplicación del proceso de extracción por microondas con medios micelares a muestras de suelos
166	III.2.2.3.1. Aplicación del proceso MAME a muestras de suelos envejecidas
170	III.2.2.3.2. Comparación de MAME con la extracción Soxhlet para muestras de suelos envejecidas
171	III.2.2.4. Aplicación del proceso MAME a una muestra de suelo certificada
174	III.3. Bibliografía

CAPITULO IV: PARTE EXPERIMENTAL	179
IV.1. Aparatos	181
IV.1.1. Cromatografía líquida de alta resolución	181
IV.1.2. Control de temperatura	181
IV.1.3. Microondas	181
IV.2. Reactivos	182
IV.3. Disoluciones	183
IV.4. Procedimientos	183
IV.4.1. Determinación de la concentración micelar crítica	183
IV.4.2. Determinación de la temperatura de punto de nube	183
IV.4.3. Determinación de la relación de volúmenes	184
IV.4.4. Análisis cromatográfico	184
IV.4.5. Extracción y preconcentración de fenoles en muestras líquidas por <i>Punto de Nube</i>	184
IV.4.6. Extracción y preconcentración de fenoles en muestras líquidas reales por <i>Punto de Nube</i>	184
IV.4.7. Extracción por microondas en medio micelar	185
IV.4.8. Extracción Soxhlet	186
IV.4.9. Acondicionamiento de muestras sólidas	186
IV.4.9.1. Sedimentos marinos	186
IV.4.9.2. Muestras de suelos	187
IV.4.10. Caracterización de suelos	187

.

IV.4.10.1. Determinación del contenido en materia orgánica	187
IV.4.10.2. Determinación del pH	188
IV.4.10.3. Tamaño de grano	188
CONCLUSIONES	191
ANEXO 1: CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA	197
1. Condiciones cromatográficas para la determinación de fenoles	199
1.1. Curvas de calibrado	202
ANEXO 2: PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES	207

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

I.1. FENOLES

El incremento en la producción y uso de compuestos químicos en los últimos cien años ha dado origen a una preocupación creciente sobre el efecto que dichos compuestos pueden tener sobre los ecosistemas terrestre y acuático.

El concepto de contaminante prioritario fue introducido por el "Clean Water Act", de los Estados Unidos de América, en 1977 (BNA, 1976). En este documento se consignó una lista de 129 sustancias químicas consideradas como contaminantes prioritarios en aguas, de las cuales posteriormente fueron eliminadas tres. Esta lista se hizo basada en criterios tales como el conocimiento de la presencia de esas sustancias en efluentes de fuentes puntuales, en el medio ambiente acuático, en peces y en agua de abastecimiento, y por medio de la evaluación siguiente:

- Carcinogenicidad
- Mutagenicidad
- Teratogenicidad
- Bioacumulación
- Persistencia

Los contaminantes prioritarios, tanto los llamados convencionales (demanda bioquímica de oxígeno, sólidos suspendidos totales, pH, coliformes fecales y grasa y aceite) como los no convencionales (todos los contaminantes a excepción de los incluidos entre los convencionales), constituyen la clasificación de contaminantes adoptada por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA). Entre estos contaminantes prioritarios se encuentran 11 derivados fenólicos (Tabla I.1) [1].

El impacto de los fenoles en el medioambiente es un tema de gran interés debido a la alta toxicidad de algunos fenoles sustituidos. Estos compuestos son derivados del benceno que se obtienen reemplazando uno o más átomos de hidrógeno del anillo bencénico por otros átomos como cloros, grupos nitro o grupos alquilo. Son utilizados generalmente como pesticidas, en la industria farmacéutica, en la fabricación de tintes, pinturas, como conservantes de la madera, fibras vegetales y pieles. Normalmente son liberados al medio por industrias que utilizan el cloro en sus procesos químicos como, por ejemplo, las industrias papeleras y las plantas de conservación de madera, entre otras.

Compuesto	Abreviatura
Fenol	PH
2-Clorofenol	2-CP
2,4-Diclorofenol	2,4-DCP
2,4,6-Triclorofenol	2,4,6-TCP
Pentaclorofenol	4,6-DNOC
2,4-Dimetilfenol	2,4-DMP
4-Clorometacresol	4-CMC
2-Nitrofenol	2-NP
4-Nitrofenol	4-NP
2,4-Dinitrofenol	2,4-DNP
4,6-Dinitroortocresol	PCP

 Tabla I.1.
 Lista de fenoles considerados contaminantes prioritarios por la USEPA.

Asimismo, la Unión Europea (normativa 80/778/EC) establece que la máxima concentración admisible (MAC) de fenoles en agua potable no debe superar 0.5 µg.L⁻¹ de fenoles totales y 0.1 µg.L⁻¹ como concentración máxima individual. Esta normativa está recogida en el Real Decreto 1138/1990 del 14 de septiembre (BOE del 20 de septiembre de 1990). La Unión Europea ha establecido también niveles para aguas naturales susceptibles de ser potabilizadas. La normativa 75/440/EC clasifica este agua en tres tipos en función

del tratamiento requerido para su potabilización y establece valores máximos de concentración de fenoles entre 1 y 10 μ g.L⁻¹. Por otra parte, la normativa 76/160/EC (Real Decreto 734/1988 del 11 de julio) establece una concentración máxima de fenoles en aguas de baño de 5 μ g.L⁻¹. Por último, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda concentraciones máximas del 2,4,6-triclorofenol, 2-clorofenol y pentaclorofenol de 200, 10 y 9 μ g.L⁻¹, respectivamente.

N°	Nombre	Abreviatura	Fórmula
1	Fenol	РН	C ₆ H ₆ O
2	4-Nitrofenol	4-NP	$C_6H_5NO_3$
3	2,4-Dinitrofenol	2,4-DNP	$C_6H_4N_2O_5$
4	Paracresol	PC	C7H8O
5	2-Nitrofenol	2-NP	$C_6H_5NO_3$
6	2-Clorofenol	2-CP	C ₆ H₅ClO
7	4-Clorofenol	4-CP	C ₆ H₅ClO
8	2,4-Dimetilfenol	2,4-DMP	C ₈ H ₁₀ O
9	4,6-Dinitroortocresol	4,6-DNOC	$C_6H_6N_2O_5$
10	4-Clorometacresol	4-CMC	C7H7CIO
11	2,4,6-Trimetilfenol	2,4,6-TMP	C ₉ H ₁₂ O
12	2,4-Diclorofenol	2,4-DCP	C ₆ H₄Cl₂O
13	4-Cloro-3,5-dimetilfenol	4-C-3,5-DMP	C ₈ H ₉ CIO
14	2,4,6-Triclorofenol	2,4,6-TCP	C ₆ H ₃ Cl ₃ O
15	Pentaclorofenol	PCP	C₀HCl₅O

Tabla I.2.	Fenol y	derivados	fenólicos	estudiados
------------	---------	-----------	-----------	------------

•

Los analitos estudiados en esta tesis son un grupo de derivados fenólicos entre los que se incluyen clorofenoles, nitrofenoles y alquilfenoles. Los sustituyentes en el anillo bencénico determinan las propiedades físicas y químicas de los derivados fenólicos, por lo que la capacidad para adsorberse en muestras sólidas o la solubilidad que presentan los mismos en muestras líquidas será diferente para cada tipo de compuestos. También se han incluido otros fenoles en los que se combinan grupos diferentes para determinar la importancia de un grupo de átomos sobre otro y su influencia en los procesos de extracción. Entre los quince fenoles estudiados, Tabla I.2, se encuentran los 11 incluidos en la lista de la USEPA.

Las propiedades fisicoquímicas de los compuestos químicos son importantes para establecer la toxicidad de los mismos, en especial en aquellas sustancias consideradas como posibles contaminantes ambientales. Algunas sustancias estables y liposolubles pueden contaminar alimentos de consumo humano y producir efectos nocivos cuando éstos son ingeridos. Propiedades como la presión de vapor y la dimensión y densidad de las partículas son variables importantes para predecir el transporte atmosférico de las sustancias químicas. La adsorción de una sustancia química en las partículas del suelo puede aumentar la probabilidad de que dicha sustancia sea transportada por el aire o por el agua y así podría depositarse en lugares remotos de su sitio de aplicación; o bien, puede retardar el movimiento de la misma a través de las aguas subterráneas, reduciendo la probabilidad de contaminación de las fuentes de agua subterráneas físicas y químicas de los fenoles estudiados. La Figura I.1 muestra las estructuras de los derivados fenólicos estudiados.

A continuación se describen las características, usos y vías de entrada al medioambiente de los fenoles estudiados en esta tesis. Se ha hecho especial hincapié en los clorofenoles debido a su mayor uso y toxicidad.



Figura I.1. Estructura de los fenoles estudiados.

Compuesto	Masa molecular relativa	Densidad (g.mL ⁻¹)	Punto de ebullic≀ón (ºC)	Punto de fusión (ºC)	pka
PH	94.11	1.07	181.75	40.8	9.99
2-CP	128.56	_ ^a	174.9	9.3	8.55
4-CP	128.56	-	220.0	43.0	9.38
2,4-DCP	163.00	1.38	210.0	37-40	7.85
2,4,6-TCP	197.50	1.49	246.0	69.0	7.42
PCP	266.40	1.98	300.0	190.0	4.93
PC	108.14	1.03	202.0	35	-
2,4-DMP	122.16	0.96	211.5	25.4-26	10.60
2,4,6-TMP	136.19	-	-	70-72	-
2-NP	139.11	1.49	216.0	44-45	7.21
4-NP	139.11	1.27	279.0	113-114	7.16
2,4-DNP	184.11	1.68	-	112-114	4.09
4,6-DNOC	198.13	-	312.0	87.5	4.34
4-CMC	142.58	-	235.0	66-68	9.55
4-C-3,5-DMP	156.61	-	-	114-116	-

Tabla I.3. Propiedades físico-químicas del fenol y sus derivados.

^a Dato no disponible.

I.1.1. Clorofenoles

Existen 19 clorofenoles diferentes formados al sustituir los hidrógenos del anillo bencénico por átomos de cloro. Entre ellos hay 3 monoclorofenoles, 6 diclorofenoles, 6 triclorofenoles, 3 tetraclorofenoles y un pentaclorofenol. Sólo 8 de los clorofenoles están en uso comercial, pero todos pueden estar presentes como contaminantes en muchos productos debido a que se pueden formar por la cloración de aguas o por degradación de fenoles más complejos en el medio ambiente.

Hay dos maneras básicas de producir clorofenoles. Una es clorar sucesivamente el fenol y la otra es hidrolizar clorobencenos. Este último proceso, especialmente a altas temperaturas, puede producir dioxinas. Por esta razón,

todos los productos producidos a partir de clorobencenos están contaminados con dioxinas en cierto grado [2,3].

Todos los clorofenoles tienen puntos de ebullición a temperaturas superiores al punto de ebullición del agua, la mayoría de ellos, por encima de los 200°C, o incluso pueden sublimarse. Sólo el 2-CP es líquido a temperatura ambiente, los otros son generalmente sólidos cristalinos en forma de agujas. Las presiones de vapor son bajas y tienden a disminuir en los fenoles con un mayor número de átomos de cloro en la molécula.

Los clorofenoles son ácidos débiles y la constante de disociación generalmente aumenta con el número de átomos de cloro en la molécula. Las especies neutras son adsorbidas más fuertemente que las especies iónicas. A medida que el número de cloros aumenta, la solubilidad de las especies neutras decrece y la adsorción aumenta (Tabla I.4). Algunos clorofenoles, particularmente el PCP, se ioniza bien por debajo del pH ambiental, de esta manera los animales entran en contacto con los clorofenoles ionizados presentes en disoluciones acuosas.

La vida media de estos compuestos es bastante corta en la mayoría de las condiciones naturales: los valores van desde días a semanas y, en algunas ocasiones, meses. Por tanto, la acumulación de niveles altos de clorofenoles en los organismos y el mantenimiento de dichos niveles se debe a un constante aporte de los mismos.

Las bacterias descomponen los clorofenoles mediante dos mecanismos diferentes: ruptura del anillo, por lo que pasan a ser compuestos alifáticos en vez de aromáticos, y la decloración. El primero de estos mecanismos ocurre en primer lugar y más fácilmente.

Compuesto	Solubilidad
2-CP	28 g/L a 20°C
4-CP	27 g/L a 20⁰C
	4.5-4.6 g/L a 20⁰C
2,4-DCP	4.5 g/L a 25⁰C
	6.2 g/L a 25⁰C y pH 5.1
	800-900 mg/L a 25°C
2,4,0-10P	434 mg/L a 25℃ y pH 5.1
	5 mg/L a 0ºC
	12 g/L a 15⁰C
BCB	14 g/L a 20⁰C
FGF	9.6 g/L a 25⁰C y pH 5.1
	20 g/L a 30⁰C
	35 g/L a 50⁰C

Tabla I.4. Solubilidad en agua de algunos clorofenoles [7].

Una definición bastante completa de tóxico, agente tóxico o sustancia tóxica, es la que se encuentra en el Registro de Efectos Tóxicos de Sustancias Químicas del U.S. National Institute for Occupational Safety and Health (U.S. NIOSH, 1976) y que define una "sustancia tóxica como la que demuestra el potencial de inducir cáncer, tumor o efectos neoplásicos en el humano o animales de experimentación; de inducir un cambio trasnmisible permanente en las características de la descendencia de aquellos padres en experimentación, humanos o animales; de causar la producción de defectos físicos en el embrión en desarrollo, de humanos o de animales de experimentación; de producir la muerte en animales de experimentación o animales domésticos expuestos por vía respiratoria, piel, ojos, boca u otras vías; de producir irritación o sensibilización de la piel, ojos o vías respiratorias; de disminuir la actividad mental, reducir la

2006

Biblioteca Universitaria,

Digitalización realizada por ULPGC.

los autores.

documento.

© Del

motivación o alterar el comportamiento humano; de efecto adverso a la salud de una persona normal o incapacitada de cualquier edad o sexo, debido a peligro de vida o por muerte debida a exposición por vía respiratoria, piel, ojos, boca, o cualquier otra vía en cualquier cantidad, concentración o dosis relatada, para cualquier período de tiempo".

La toxicidad de una sustancia química, es decir su capacidad de producir un efecto nocivo, está relacionada con la cantidad administrada o adsorbida (dosis), la vía de administración de esa cantidad, por ejemplo, vía respiratoria, digestiva, dérmica, el tipo de efecto y la gravedad del mismo, y el tiempo necesario para producirlo.

En el caso de los clorofenoles, todos los lugares de sustitución de la molécula de fenol no son iguales a efectos de toxicidad en los organismos. El 4-CP es mucho más tóxico que el 2-CP o el 3-CP, ya que la posición *para* es mucho más tóxica que las demás. Si hay sustituciones simultáneas en posición *meta* y *para*, la toxicidad también es elevada. La toxicidad se reduce para las posiciones *orto*, o las posiciones 2 y 6 simultáneas. Así la toxicidad del 2,6-DCP es menor que la del 3,5-DCP. Este hecho explica que la toxicidad del 2,4,6-TCP sea menor que la esperada. Como la toxicidad aumenta con el número de átomos de cloro, cabría esperar una toxicidad elevada para el PCP. Sin embargo, los átomos de cloro en las posiciones 2 y 6 amortiguan ese efecto y la toxicidad de este clorofenol es menor que la esperada [5-7].

La temperatura no es un factor crítico en la toxicidad de los clorofenoles en animales homeotermos (sangre caliente) pero es importante en los poiquilotermos (sangre fría). En este caso, la respiración y el metabolismo es función de la temperatura ambiental.

Los clorofenoles ionizados son menos lipofílicos por lo que la toxicidad es mayor a pH bajos. En la Tabla I.5 se dan los niveles de toxicidad de los clorofenoles estudiados.

Compuesto		Toxicidad ^a
	Seres Humanos	1 g puede ser fatal
DLI	Ratas	DL ₅₀ 414-530 mg/kg, oral
FII	Conejos	DL ₅₀ 400-600 mg/kg, oral
	Daphnia	CL ₅₀ 12 mg/L (48 h)
2-CP	Ratas	DL ₅₀ 950 mg/kg, percutáneo
4-CP	Ratas	DL ₅₀ 1390 mg/kg, percutáneo
2,4-DCP	Ratas	DL ₅₀ 1730 mg/kg, percutáneo
2,4,6-TCP	Ratas	DL ₅₀ 820 mg/kg, oral
	Ratas	DL ₅₀ 50 mg/kg, oral
PCP	Algas	CE ₅₀ 0.01-7 mg/L (96 h)
	Truchas	CL ₅₀ 0.12-0.26 mg/L (96 h)

Tabla I.5.	Toxicidad de los	clorofenoles	estudiados	[8]	١.

^a DL₅₀: dosis administrada, letal para el 50% de los individuos; CE₅₀: concentración que causa la inactivación al 50% de los individuos; CL₅₀: concentración administrada en el medio ambiente, letal para el 50% de los individuos.

La cantidad y la calidad de los clorofenoles comerciales varía ampliamente. Como se indicó anteriormente, uno de los métodos para producir clorofenoles, la hidrólisis de clorobencenos, produce dibenzo-p-dioxinas contaminando el producto en cierto grado.

La Tabla I.6 da los niveles de contaminantes en el 2,4-DCP comercial. Como este producto se utiliza para la fabricación del herbicida 2,4-D (ácido 2,4diclorofenoxiacético), estos contaminantes se distribuyen en la naturaleza mientras se usa el 2,4-D [9,10].

El PCP contiene un gran número de impurezas dependiendo del método de fabricación. Éstas incluyen clorofenoles, particularmente isómeros TTCP

(tetraclorofenoles), PCDDs (policloro-dibenzo-p-dioxinas), PCDFs (policlorodibenzofuranos), policlorodifeniléteres, ciclohexanos clorados y ciclohexadienos, policlorofenoxifenoles, hexaclorobenceno y PCBs (bifenilos policlorados) [11]. La dioxina más tóxica, 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina, no se ha encontrado en los clorofenoles utilizados para proteger la madera [12]. Sin embargo, en un trabajo publicado por Fiedler et al. en 1990 se indica que estaba presente en el NaPCP utilizado para este propósito [13]. En un PCP disponible en Suecia se encontró que la mayoría del producto era TTCP, un 80%, y el PCP era solo una impureza en el producto [2]. La Figura 1.2 muestra algunos de los productos que contaminan el PCP.

Contaminante	Valor medio (%) (n=10)
2,6-DCP	4.48
2,4,6-TCP	4.24
2-CP	1.09
4-CP	0.46

Tabla I.6. Impurezas del 2,4-DCP comercial [1].

Debido al amplio espectro de propiedades antimicrobianas de los clorofenoles, se les ha utilizado para la preservación de la madera, pinturas, fibras vegetales y cuero, y como desinfectantes. Encuentran, además, aplicación como herbicidas, fungicidas e insecticidas y como agentes intermediarios en la fabricación de productos farmacéuticos y tintes.

Los clorofenoles menos sustituidos no se usan tanto debido a su olor penetrante, su mayor solubilidad en el agua y su mayor volatilidad. En general, los monoclorofenoles han sido usados como antisépticos desde hace más de 100 años [14]. La Tabla I.7 recoge algunas aplicaciones de los clorofenoles.

A pesar de sus vidas medias, relativamente cortas, y su facilidad para la degradación, los clorofenoles se encuentran ampliamente distribuidos en el medioambiente: en el agua, en los sedimentos, en los suelos y en organismos [24]. Esto es debido, al menos en parte, a su amplio uso. La mayoría de los países desarrollados han considerado necesario restringir el uso de clorofenoles. Inicialmente esta restricción sólo afectó a los usos domésticos y agrícolas, pero en la actualidad también se está llevando a cabo progresivamente en la conservación de la madera [11].



Figura I.2. Contaminantes frecuentes en el PCP.

El uso de muchos pesticidas clorados aumenta la cantidad de clorofenoles en el medio ambiente, ya que algunos productos de la degradación de dichos pesticidas y sus metabolitos son clorofenoles.

La descomposición de la vegetación produce fenol; los vertidos procedentes de la destilación del carbón y de la madera, refinerías petroquímicas, plantas químicas y los desagües domésticos también contienen fenoles. Éstos son convertidos en clorofenoles en los procesos de cloración en las plantas depuradoras [25]. Nuestra dependencia del cloro como herramienta para el tratamiento del agua es la responsable de la producción accidental de clorofenoles y su llegada al medio. Eliminar los compuestos orgánicos de los vertidos, antes de la cloración, o esterilizar el agua mediante ozono o radiación ultravioleta, tanto en los procesos de depuración como en los de potabilización, contribuirían a eliminar o, al menos, reducir enormemente esta fuente de clorofenoles y su distribución.

Compuesto	Utilización	Ref.
2-CP	Intermediario en la fabricación de clorofenoles, cresoles y resinas sintéticas.	15
4-CP	Intermediario en la síntesis de colorantes, del 2,4-diclorofenol y del herbicida 2,4-D. Disolvente en el refino de aceites minerales.	15,16
2,4-DCP	Intermediario en la fabricación de desinfectantes, insecticidas, protectores de la madera y en la síntesis del 2,4-D y el PCP.	17,18
2,4,6-TCP	Antiséptico, fungicida y bactericida. Agente exfoliante y antimoho. Protector de la madera (sales de sodio y potasio).	19,20
РСР	Protector de la madera. Agente conservante en textiles, cuero, papel, adhesivos, pinturas, cola para la madera y aceites. Inhibidor de la fermentación bacteriana en los fluidos procedentes de la industria petroquímica.	2,21,22,23

	Tabla I.7.	Usos de los	clorofenoles.
--	------------	-------------	---------------

Así, por ejemplo, el 2-CP se forma en un rango de concentración de 1.7 μ g.L⁻¹ durante la cloración de las agua en las depuradoras municipales [26,27]. Este compuesto es el máximo responsable del olor. También se produce como consecuencia de la descomposición del herbicida 2,4-D por *Pseudomonas* [28]. El otro monofenol, el 4-CP, se encuentra en un rango de 0.7 μ g. L⁻¹ en las aguas residuales cloradas [27].

El 2,4-DCP se forma en el rango de nano a micromolar durante la cloración de aguas en depuradoras municipales [26] y contribuye junto con el 2-CP al olor del agua. Se forma como producto de descomposición del herbicida 2,4-D y el Nitrofen [29]. Los efluentes de las fábricas de palpel de Kraft contienen este clorofenol [30].

El maíz y los guisantes metabolizan el pentaclorociclohexano y el 1,3,5triclorobenceno a 2,4,6-TCP [31]. Es también uno de los productos de la degradación de otro pesticida, el Lindano [32-34]. En los vertidos de las fábricas de papel de Kraft también se ha encontrado este clorofenol [30]. En vertidos de aguas municipales e industriales de Vancouver se encontraron niveles de hasta 3.12 μ g. L⁻¹ [35]. Se estima que, cuando el agua que contiene fenol es clorada, de un 40 a un 50% de los clorofenoles formados es 2,4,6-TCP [36]. Es también uno de los clorofenoles predominantes producidos en el blanqueo de la pulpa de papel [37].

Incineradoras, chimeneas, incendios y otros procesos en los que se produce la combustión de madera liberan PCP a la atmósfera [38]. El hexaclorobenceno y el pentaclorobenceno son productos residuales comunes en los que el metabolismo natural microbiano los convierte en PCP [39,40]. Este clorofenol se usa, además de cómo herbicida, como protector de la madera que se utiliza para la construcción de granjas, casas, vallas, cajas, postes telefónicos, etc. Todos estos usos contribuyen a que vayan a parar a cursos de agua debido a inundaciones, tormentas y otros accidentes [41,42].

Los clorofenoles son preferentemente adsorbidos en partículas orgánicas del agua y en sedimentos orgánicos [43]. La mayoría del PCP permanecerá en los sedimentos, pero otros clorofenoles tienden a dispersarse por el medio. El tamaño del sedimento afecta a la adsorción y descomposición de los clorofenoles. Por tanto, el nivel neto medido es función de la velocidad de descomposición y deposición [44].

El PCP puede ser degradado por la luz solar formándose 2,3,4,5-TTCP y 2,3,5,6 TTCP, los cuales persisten en los sedimentos [45].

En cuanto a la presencia de clorofenoles en alimentos, en frutas y hortalizas el nivel de los mismos es generalmente inferior a 10 μ g.kg⁻¹. Lo mismo ocurre con las carnes, excepto en el hígado, en el que puede llegar a 100 μ g.kg⁻¹. El PCP aparece en los alimentos [46,47] por estar en contacto con embalajes tratados con este producto. En pescado, la concentración de PCP es normalmente inferior a 4 μ g.kg⁻¹ [48]. Niveles de 1 a 100 μ g.kg⁻¹ se han encontrado en leche, refrescos, pan, dulces, arroz, cereales, azúcar y trigo [46]. El metabolito del PCP, el pentacloroanisol, se ha encontrado en niveles de 1 a 18 μ g.kg⁻¹ en pollos asados cuando los animales se crían entre virutas procedentes de madera tratada con este clorofenol [49].

Las personas están expuestas a los clorofenoles, principalmente el PCP, en sus alimentos, en el agua y el aire. En E.E.U.U. y Alemania se estima que son 6 µg/día en alimentos, 2 µg/día en agua y 2 µg/día en el aire. Otras fuentes incluyen fábricas, desinfectantes, reactivos para fotografía, productos farmacéuticos y moquetas [11].

En zonas contaminadas, el nivel de PCP está por debajo de µg.kg⁻¹ pero puede llegar a los mg.kg⁻¹ en áreas industrializadas, como ocurre en torno a los Grandes Lagos: sus niveles son altos y persistentes en los sedimentos del lago, suelos y en la hojarasca [45,50-52].

Los niveles de PCP en peces son generalmente altos y persistentes en zonas industrializadas. En zonas de tratamiento de madera se encontraron niveles de 7 µg.kg⁻¹ en cangrejos, 20 µg.kg⁻¹ en mejillones y 1700 µg.kg⁻¹ en gusanos *Polychaete*. En la Tabla I.8 se muestran los valores de 2,4,6-TCP encontrados en tejidos de diferentes organismos en lagos contaminados en Finlandia [53].

17

Organismo	Concentración (µg.kg ^{.1})
Lucios	13.6-17.3
Escarchos	4.7-55.9
Almejas	1.4
Esponjas	5.0-6.9
Plancton	2.5

Tabla I.8. Concentraciones de 2,4,6-TCP en tejidos de organismos marinos.

La Tabla I.9 muestra la concentración de PCP acumulada en tejidos de diferentes organismos después de 96 horas de exposición al producto [54].

Organismo	Concentración en el agua (μg.L ⁻¹)	Concentración en tejido (µg.kg ⁻¹)
	46.0	290
Peces (Mugil cephalotis)	88.0	6700
	157.0	8800
	32.0	50
Gambas (Palaemonetes pugio)	54.0	100
	249.0	430
	2.8	180
Ostras (Grassostrea virginica)	26.0	860

Tabla I.9. Acumulación de PCP en tejidos de organismos marinos.

I.1.2. Alquilfenoles

Los alquilfenoles pueden ser sintetizados usando diferentes métodos, incluyendo la alquilación de fenoles usando diferentes catalizadores, hidroxilación

de un alquilbenceno, deshidrogenación de un alquilciclohexanol, o a partir de un compuesto de ciclo abierto sustituido. La elección del proceso depende del alquilfenol a sintetizar, de la disponibilidad de los materiales y del costo del proceso. La técnica usada generalmente para sintetizar los alquilfenoles es la alquilación de Friedel-Crafts. Cadenas de 3 a 12 átomos de carbono se someten a catálisis utilizando ácido sulfúrico.

Los cresoles, o metilfenoles, se encuentran en la madera y en otros materiales biogénicos. Se obtienen a partir de la hulla o del petróleo. El denominado "cresol crudo" que se obtiene a partir del aceite pesado de alquitrán de hulla contiene considerables cantidades de metacresol y paracresol.

Este tipo de compuestos se utilizan como desinfectantes, perfumes, agentes conservantes o herbicidas. También encuentran aplicación en la industria textil como agentes de limpieza.

Los cresoles son expulsados hacia el medio ambiente por procesos de combustión en vehículos automotores y en sistemas de calefacción domésticos (abrasión del asfalto, vaporización de plásticos, perfumes, desengrasado de metales, etc.). La gran mayoría de los cresoles sufren descomposición fotoquímica.

En el agua se disuelven muy lentamente, pero aun estando muy diluidos forman mezclas que resultan muy tóxicas para los organismos acuáticos. Debido a que los cresoles se adsorben en los minerales arcillosos, puede producirse una acumulación de los mismos en el sedimento. Si se infiltran en las capas subterráneas pueden llegar a contaminar las aguas.

Cuando es liberado a la atmósfera, el p-cresol reaccionará con radicales hidroxilo producidos durante el día (vida media 10 horas) y con los grupos nitro producidos durante la noche (vida media 4 minutos). En el agua, el p-cresol sufre biodegradación por lo que la volatilización, la acumulación en peces o la adsorción en sedimentos es poco importante. En aguas de ríos, la dilución es más

19

importante que la biodegradación y puede producirse fotolisis, catalizada por ácidos húmicos, en aguas superficiales. En aguas marinas y sedimentos la vida media del p-cresol es de 4 y 2 días, respectivamente. En la Tabla I.10 se muestan los niveles de toxicidad del p-cresol en algunos organismos [8].

Compuesto		Toxicidad ^a
	Ratas	DL_{50} 1.8 g.kg ⁻¹ , oral
PC	Conejos	DL_{50} 1.1 g.kg ⁻¹ , oral
	Algas Cianofíceas	DL ₀ 6.8 mg.L ⁻¹
	Carpas	TLm 21 mg.L ⁻¹ (24 h)

Tabla I.10. Toxicidad del p-cresol en algunos organismos.

^a DL₀: dosis máxima tolerada; TLm: límite de tolerancia media.

El 2,4-dimetilfenol se utiliza en la industria farmacéutica, en la fabricación de plásticos, aditivos para lubricantes y gasolinas, agentes humectantes y pesticidas. Este producto se libera al medioambiente en las fábricas de plásticos, industrias químicas y en el refino y procesado del carbón. Cuando llega al agua es biodegradado a temperatura ambiente en un periodo que va desde unas horas hasta unos pocos días. En aguas superficiales claras puede sufrir fotolisis. La acumulación en partículas y sedimentos del agua es moderada y la bioacumulación en peces no es significativa. En el suelo puede degradarse en un intervalo de 4 a 19 días. En la atmósfera, se degrada durante las horas del día mediante reacciones fotoquímicas con radicales hidroxilo. Durante la noche se degrada rápidamente por reacción con grupos nitro [8].

I.1.3. Nitrofenoles

Los isómeros del nitrofenol son sólidos hidrosolubles con una acidez moderada en agua debido a la disociación. El 2-nitrofenol y el 4-nitrofenol se

utilizan como intermediarios en la síntesis de diversos plaquicidas organofosforados y algunos productos farmacéuticos. El 4-nitrofenol es un producto de degradación de insecticidas organofosforados derivados del paratión. Pero también se utiliza como producto intermediario en su producción [55-60] y en la del analgésico Paracetamol (N-acetil-4-aminofenol) [8]. La liberación en el medio ambiente se produce fundamentalmente por emisiones en el aire, el agua, y el suelo a partir del tráfico de vehículos, la degradación hidrolítica y fotolítica de los respectivos plaguicidas.

Habida cuenta de la solubilidad en agua y la presencia prevista en la fase de vapor, cabe esperar una deposición húmeda de nitrofenoles del aire en las aguas superficiales y en el suelo. Numerosos estudios sobre la biodegradación del 2-nitrofenol y el 4-nitrofenol indican que los isómeros son biodegradables en el agua en condiciones aerobias.

Poseen un potencial de adsorción de bajo a moderado en el suelo. Los nitrofenoles liberados al suelo se descomponen mediante biodegradación, por lo que su filtración hacia el agua freática sólo ocurriría bajo condiciones desfavorables para la biodegradación [8].

En cuanto a la toxicidad del 4-nitrofenol, en animales experimentales a los que se les administró excretaron la mayor parte de la dosis aplicada por vía urinaria en un plazo de 24-48 horas en forma de conjugados de glucurónidos y sulfatos. Los datos para el 2-nitrofenol son muy limitados, aunque se supone una transformación metabólica comparable. De los resultados disponibles de pruebas válidas sobre la toxicidad del 2-nitrofenol y el 4-nitrofenol para diversos organismos acuáticos, los nitrofenoles se pueden clasificar como sustancias con una toxicidad entre moderada y alta en el medio acuático. Por consiguiente, a pesar de la descomposición biótica y fotoquímica, estos compuestos emitidos al agua pueden representar algún peligro para los organismos acuáticos sensibles, particularmente en aguas superficiales que no favorezcan estas vías de eliminación [61].

21

El 2,4-dinitrofenol es utilizado fundamentalmente como intermediario en la producción de colorantes azoicos, pero también ha sido usado como fungicida para la madera y como insecticida [62]. Este producto puede llegar al medioambiente a través de las emisiones o vertidos de las industrias químicas en las que se utiliza, debido a su uso como pesticida y, también, por las emisiones de los automóviles. Aunque no se adsorbe fácilmente en los sedimentos, sí puede hacerlo en suelos con un alto contenido en arcillas. Puede ser degradado por microorganismos mediante transformaciones que incluyen reducción del grupo nitro, hidroxilación del anillo y desplazamiento del grupo nitro. En el agua este fenol reacciona con radicales alquilperóxido (vida media 58 días) y puede sufrir fotolisis debido a la absorción de radiación ultravioleta [8].

I.2. SURFACTANTES

Los surfactantes (contracción de los términos ingleses "surface", "active" y "agent") son sustancias cuya estructura molecular presenta dos grupos con carácter diferente: un grupo no polar (hidrofóbico) y otro polar o iónico (hidrofílico). Este tipo de estructura se denomina "anfipática". El grupo no polar, que generalmente es una cadena hidrocarbonada, con un número de átomos de carbono comprendido entre ocho y dieciocho, constituye la "cola" de la molécula de surfactante, mientras que el grupo polar, que puede ser de naturaleza iónica o no iónica, forma la "cabeza" de la misma.

Esta estructura "anfipática" de las moléculas de surfactante le confiere unas propiedades muy especiales al mismo. Entre ellas, la posibilidad de reducir la tensión superficial del agua y la de adsorberse en las superficies e interfases de un sistema formado por fases inmiscibles, fenómeno responsable de la mayoría de las aplicaciones industriales de los surfactantes como detergentes, estabilizadores emulsionantes, etc. y la formación de micelas.

Cuando el surfactante se disuelve en agua, la presencia del grupo hidrofóbico en el interior del agua causa distorsión provocando un aumento de la energía libre del sistema, lo que significa que el trabajo necesario para llevar una molécula de surfactante a la superficie es menor que el trabajo para trasladar una de agua. Por tanto, el surfactante se encontrará en la superficie. Esto hace que disminuya el trabajo necesario para aumentar la unidad de área de dicha superficie, es decir, su tensión superficial.

Por otra parte, la presencia del grupo hidrofílico impide que el surfactante sea expulsado completamente del disolvente, lo que requeriría la deshidratación de dicho grupo. La estructura "anfipática" del surfactante causa no sólo la concentración del mismo en la superficie, sino también la orientación de la molécula con su grupo hidrofílico en la fase acuosa y su grupo hidrofóbico hacia el exterior [63-65].

23

Dependiendo de la naturaleza del grupo polar, los surfactantes se clasifican en cuatro grupos principales [66]:

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

En la Tabla I.11 se recogen ejemplos de estos cuatro tipos de surfactantes.

En disoluciones muy diluidas, los surfactantes suelen encontrarse como monómeros, dímeros, etc. Pero si la concentración de la disolución aumenta se produce un proceso de agregación que da lugar a cambios en las propiedades físicoquímicas de la disolución. El agregado coloidal que se forma recibe el nombre de "micela" (cluster). El número de moléculas de surfactante que pueden formar la micela se denomina *número de agregación* (N) y se halla en un rango de 50 a 100 [64,67].

Hay una concentración, característica para cada surfactante, a partir de la cual se forma la micela. A esta concentración se le denomina *concentración micelar crítica* (CMC). El proceso de agregación se da en un pequeño intervalo de concentraciones y parece ser un proceso altamente cooperativo. Puede considerarse que la formación de micelas es un mecanismo alternativo a la adsorción en las interfases para evitar el contacto entre los grupos hidrofóbicos y el agua, y así disminuir la energía libre del sistema [63].

	Surfactantes
	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
Catiónicos	Bromuro de tetradeciltrimetilamonio
Cationicos	Bromuro de dodeciltrimetilamonio
	Cloruro de dodecilamonio
	Tetradecilsulfato de sodio
Aniónicos	Dodecilsulfato de sodio (laurilsulfato de sodio)
	Dodecilsulfonato de sodio
	Dodecanoato de sodio
Zwitteriónicos	N-Dodecilbetaína
Zwitterionicos	N-Dodecilsultaína
	Poliexietilen 10 Lauril éter (POLE)
No iónicos	Polioxietilen 23 dodecanol (Brij 35)
	Triton X-100
	Sorbitol Monooleato (Tween 80)

Tabla I.11. Relación de sistemas micelares.

La forma de la micela varía dependiendo del surfactante y del medio. Presentan el grupo hidrofóbico, la cola, orientado hacia el interior de las mismas (corazón), mientras que el grupo hidrofílico, la cabeza, hacia el exterior de la micela. Es posible que se formen micelas en medios orgánicos no polares. En este caso la micela formada recibe el nombre de "micela inversa". Aquí, la disposición de las moléculas de surfactante es contraria a la descrita anteriormente, es decir, los grupos hidrofóbicos se extienden hacia la fase no polar y los hidrofílicos hacia el interior de la micela [67].

Las micelas son esféricas, pero cuando la concentración de surfactante aumenta, la forma de las micelas iónicas cambia siguiendo la secuencia esférica-

cilíndrica-hexagonal-laminar. En el caso de los surfactantes no iónicos las micelas pasan directamente de forma esférica a laminar al aumentar la concentración de surfactante [68-72].

Las propiedades microscópicas de las micelas, especialmente del "core" central, son muy diferentes a las del disolvente que las circunda y las micelas pueden ser consideradas como una segunda fase. Aunque la disolución sea considerada microscópicamente heterogénea, las propiedades macroscópicas del sistema total corresponden a una disolución verdaderamente homogénea.

El proceso de micelización se pone en evidencia por los cambios en las propiedades físico-químicas de la disolución: tensión superficial, presión osmótica, conductividad, etc.

I.2.1. Concentración micelar crítica

Anteriormente se comentó que el estrecho rango de concentraciones en las que se producen cambios bruscos en las propiedades físicoquímicas en disoluciones de surfactantes se le llama *concentración micelar crítica*, CMC. Para determinar el valor de este parámetro se puede utilizar el cambio en algunas de esas propiedades y así, normalmente, se suele medir la conductividad eléctrica, la tensión superficial o el índice de refracción. Otras propiedades utilizadas para hallar la CMC son la densidad, la turbidez óptica, la viscosidad, el coeficiente osmótico, etc. [73,74]. La determinación de la CMC a partir de cambios en el color, espectros de absorción o cantidad de solubilización es más popular en trabajos comerciales y han sido ampliamente utilizadas en estudios fundamentales.

Todas estas propiedades no son igual de convenientes para determinar la CMC, ni dan los mismos resultados. En algunos casos existen variaciones de casi un 50 % en los valores de la CMC obtenidos. Algunas de las variaciones puede deberse a la presencia de impurezas o a los procedimientos utilizados para el cálculo de la CMC: podemos representar la conductancia molar frente a la raíz cuadrada de la concentración o la conductividad frente al logaritmo de la

concentración [73].

En general, se encuentra que los valores de la CMC son menores para los surfactantes aniónicos que para los catiónicos y para los surfactantes no iónicos los valores son menores que para los iónicos, y los números de agregación mas altos [75]. Esto se debe en parte a la ausencia de repulsiones electrostáticas entre las cabezas de los surfactantes no iónicos. Sin embargo, en las micelas iónicas estas repulsiones tienden a limitar el número de agregación y la CMC. En la Tabla I.12 se presentan valores de CMC para diferentes tipos de surfactantes.

Surfactante	CMC (mM)	Ref.
Lauril sulfato sódico (NaLS)	8.100	68
Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB)	0.920	76
Polioxietilen 10 Lauril éter (POLE)	0.090	77
Brij 30	0.064	78
Triton X-100	0.250	79
PONPE-7.5	0.085	80
Tween 80	0.012	81

Tabla I.12.	Concentraciones	micelares	críticas	para	diferentes	tipos	de
surfactantes							

I.2.2. Surfactantes no iónicos

La mayoría de los surfactantes no iónicos son "aductos" de óxido de etileno. Los grupos polioxietilén son la parte hidrofílica de la molécula de surfactante. La parte lipofílica de la molécula puede ser una variedad de grupos apolares, incluidas cadenas alquílicas (alcoholes, ácidos grasos o amidas), alquilbencenos y sus derivados fluorados, derivados de la silicona o cadenas de polioxipropileno [82]. En la Tabla I.13 aparecen recogidos los diferentes tipos de
surfactantes no iónicos así como su estructura y fórmula general.

Tabla I.13. Surfactantes no iónicos [84].

Тіро	Estructura	Fórmula
Polioxietilen alquil éteres		C _i E _j
C ₁₂ E ₄ (Brij 30)		
C ₁₂ E ₉ (Polidocanol)	CH ₃ -(CH ₂) _{i-1} O-(CH ₂ CH ₂ O) _j H	
C ₁₂ E ₁₀ (POLE)		
C ₂₅ E ₁₀ (Brij 56)		
Polioxietilen metil-n-alquil éteres	CH ₃ -(OCH ₂ CH ₂) _m O·(CH ₂) _n H	CiEmCn
Octilfenoxi polioxietilen éteres	CH, CH,	OPE _x
OPE5 (Triton X-45)		
OPE7-8 (Triton X-114)		
OPE9-10 (Triton X-100)		
Polioxietilen nonilfenil éteres		NPE
NPE7.5 (PONPE-7.5)		
NPE8-9 (Igepal CO-610)		
NPE9-10 (Triton N-101)		
Polioxietilen sorbitan éteres de ácidos grasos	H(OCH ₂ CH ₂)O(CH ₂ CH ₂ O)H	
Tween 20 (Sorbitol Monolaurato)		
Tween 40 (Sorbitol Monopalmitato)	0 0 (0CH ₂ CH ₂) _z -R	
Tween 80 (Sorbitol Monooleato)		
Sistemas misceláneos		

Los surfactantes no iónicos del tipo polioxietilen alquil éteres fueron sintetizados por primera vez a principios de los años 30 [83]. Desde entonces, su detergencia, sus propiedades humectantes y esponjantes y los usos generales como surfactantes no iónicos los ha hecho ampliamente utilizados en la industria y como productos domésticos.

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

El problema de los surfactantes no iónicos del tipo $C_n E_m$ es que su síntesis implica la polimerización de los óxidos de etileno. El producto final obtenido es realmente una mezcla de moléculas con *n* átomos de carbono en la cadena alquílica, si el alcohol de partida es puro, y un número de unidades de óxido de etileno en el rango desde *m*-*a* hasta *m*+*a*, siendo *a* una constante que depende del proceso [85]. Por ejemplo, el análisis de un $C_{12}E_{10}$ comercial (Polioxietilen 10 Lauril éter) da los resultados mostrados en la Tabla I.14 [82]. En este caso particular, el 81,8 % no corresponde a la molécula de $C_{12}E_{10}$.

En la mayoría de las aplicaciones de los surfactantes no iónicos esta dispersión en el número de unidades oxietilénicas no es un problema. Se convierte en problema cuando es necesario determinar las propiedades físicas y químicas del surfactante. Este hecho explica la variación observada en la bibliografía acerca de los datos de concentración micelar crítica, volúmenes molares o temperatura de punto de nube [82,85].

En un estudio realizado por Berthod et al. [86] se analiza el efecto del número de unidades oxietilénicas, así como el número de átomos de carbono en la cadena alquílica, en la concentración micelar crítica. Encontró que la CMC de los surfactantes del tipo $C_n E_m$ disminuye exponencialmente con el número de átomos de carbono de la cadena alquílica. La variación es del mismo tipo,

29

exponencial, con el número de unidades oxietilénicas en la cadena hidrofílica, si bien este cambio es menor.

Molécula	% en masa
C ₁₂ E ₃	0.02
C ₁₂ E ₄	0.45
C ₁₂ E ₅	2.00
C ₁₂ E ₆	5.00
C ₁₂ E ₇	8.60
C ₁₂ E ₈	11.70
C ₁₂ E ₉	18.30
C ₁₂ E ₁₀	18.20
C ₁₂ E ₁₂	9.57
C ₁₂ E ₁₅	3.55
C ₁₂ E ₂₀	0.30

Tabla I.14.	Análisis de un C ₁₂ E ₁₀ comercial.
-------------	---

Con cadenas alquílicas cortas se produce un aumento de la CMC, pero con cadenas alquílicas largas la CMC disminuye, Figura I.3. El $C_{12}E_m$ parece tener una CMC próxima a 10^{-4} mol.L⁻¹, independientemente del número de unidades oxietilénicas presentes en la molécula.

En este estudio se propone la siguiente ecuación general para obtener la concentración micelar crítica, en moles. L⁻¹, de cualquier surfactante no iónico del tipo $C_n E_m$ en los rangos 5< *n* <16 y 3< *m* <30

$$\log CMC = -0.011 n_C m_E + 0.135 m_E - 0.433 n_C + 1.117$$

n_c indica el número de átomos de carbono en la cadena alquílica

m_E representa el número de unidades oxietilénicas en la molécula

La masa molar de un surfactante del tipo $C_n E_m$ se puede obtener a partir de la expresión:

Si se combinan las dos ecuaciones anteriores se puede obtener la concentración micelar crítica, en g_{L} ⁻¹, para un surfactante no iónico del tipo $C_n E_m$:

 $\log CMC = \log (14n_{c} + 44m_{E} + 18) - 0.011n_{c}m_{E} + 0.135m_{E} - 0.433n_{c} + 1.117$



Fig.I.3. Representación del log CMC (moles.L⁻¹) frente al número de unidades oxietilénicas de un surfactante no iónico del tipo $C_n E_m$ [86].

Una de las propiedades más importantes de los surfactantes, directamente relacionada con su capacidad de formar micelas, es la solubilización de solutos. La mayoría de las aplicaciones de las micelas en medios acuosos se basan en esta propiedad [65, 87].

La solubilización de un analito en una micela determinada es un proceso de equilibrio dinámico y depende tanto de la naturaleza del soluto como del medio micelar empleado. En medios micelares, la cantidad de soluto solubilizado es directamente proporcional a la concentración de surfactante utilizado, una vez que la formación de micelas ha tenido lugar. La solubilización es un fenómeno claramente micelar. Una vez sobrepasada la CMC comienza la solubilización, pudiendo el soluto unirse a la micela en diferentes regiones de la misma dependiendo de la naturaleza del soluto y del surfactante. En la Figura I.4 se muestra una representación esquemática de estas solubilizaciones.



Figura I.4. Representación esquemática para la solubilización de solutos en las micelas.

Las interacciones entre ambos pueden ser electrostáticas, hidrofóbicas o más normalmente, una combinación de ambos efectos [65]. Aunque el mecanismo real de solubilización es complejo, se puede aceptar que los sustratos iónicos con carga opuesta a los grupos de cabeza de las micelas se pueden enlazar

fuertemente a ellos; las especies no polares que poseen electrones polarizables, como los compuestos aromáticos, residen cerca del grupo de cabeza, mientras que los radicales alquílicos interaccionan con el core de la micela, de modo que las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas micela-soluto sean máximas. Los solutos apolares se localizan en el core de la micela.

La constante de equilibrio, K, de la incorporación del soluto a la micela:

Soluto + micela ↔ micela-soluto

se define como

$$K = [S_{mic}] / [S_{ac}] C_d$$

donde $[S_{mic}]$ y $[S_{ac}]$ son las concentraciones estequiométricas del soluto en la fase micelar y en la fase acuosa, respectivamente, y C_d es la concentración analítica del surfactante (que es igual a la concentración total de surfactante menos la concentración micelar crítica del mismo) [88]. Esta constante de equilibrio puede ser referida al coeficiente de partición (o distribución) P, distribución del soluto entre el disolvente y las micelas del surfactante. Este coeficiente se define como la relación entre la concentración de soluto en la fase micelar y aquella en la fase principal de la disolución. Por tanto, la constante de equilibrio vendría expresada por:

donde v es el volumen molar parcial del surfactante [89].

Las micelas no son sistemas estáticos sino que están, junto con los solutos que han sido solubilizados por ellas, en equilibrio dinámico con el medio que las rodea [90]. Las moléculas de surfactante entran y salen de la micela en microsegundos. Estos monómeros y los solutos asociados pueden ser sustituidos por otros presentes en la disolución, en otras micelas o adsorbidos en otras superficies. La disolución completa y la redistribución de una micela pueden ocurrir

en milisegundos [91,92].

Se ha destacado la importancia de los medios micelares en la solubilización de especies químicas debido a su capacidad selectiva. Sin embargo, también hay que mencionar su intervención en otros procesos como pueden ser el desplazamiento de equilibrios, la modificación de cinéticas de reacción, aumento de fluorescencia y fosforescencia, procesos de extracción y preconcentración y separación por cromatografía líquida o en capa fina [93-96].

I.2.3. Aplicaciones de los medios micelares

La utilidad analítica de las micelas es evidente en un gran número de técnicas y ha crecido enormemente en los últimos años. Las aplicaciones más importantes de los medios micelares en química analítica se pueden clasificar en tres grandes apartados [88,95,97]:

• Medidas electroquímicas.

En análisis electroquímico desde hace unos años se ha visto la gran utilidad de las disoluciones de surfactantes con una concentración superior a la *concentración micelar crítica*. El uso de estas disoluciones puede producir un aumento de la sensibilidad de las técnicas electroanalíticas.

• Espectroscopía.

La utilidad de las micelas en los métodos espectroscópicos de análisis ha ido aumentando enormemente en los últimos años. El uso de los surfactantes permite mejorar la determinación espectrofotométrica y fluorimétrica de muchos iones metálicos con indicadores metalocrómicos. Por otra parte, ciertos quelatos binarios pueden aumentar drásticamente su rendimiento cuántico, lo que se traduce en un aumento de la sensibilidad analítica [98-101].

Separaciones.

Los medios micelares se han utilizado en separaciones analíticas debido a la capacidad que poseen las micelas para interaccionar selectivamente con las moléculas, destacando su importancia en tres campos: procesos de extracción, cromatografía y separaciones electrocinéticas.

Las micelas poseen la capacidad de solubilizar compuestos orgánicos y quelatos de metales insolubles en agua. De esta forma se pueden extraer los sustratos o complejos insolubles del medio acuoso en una fase de mucho menor volumen que está formada casi enteramente por surfactante. Esto supone una concentración de los analitos con el consiguiente aumento de sensibilidad al realizar el análisis.

Esta técnica de extracción por separación de fases se basa en la propiedad que presentan las disoluciones acuosas de los surfactantes no iónicos de separarse en dos fases cuando se calientan por encima de una determinada temperatura: la temperatura de *cloud point* o temperatura de *punto de nube*. La disolución homogénea se separa en dos fases, una fase acuosa y otra fase rica en surfactante. Un soluto disuelto en la disolución homogénea a baja temperatura puede tener más afinidad por una fase que por la otra. La extracción por *cloud point* (CPE) se usa comúnmente para extraer y/o preconcentrar solutos apolares en la fase rica en surfactante obtenida al elevar la temperatura [65,87,102,103].

Sobre este tema se hará especial hincapié en el Capítulo II, ya que el estudio de la extracción de fenoles por *punto de nube* constituye uno de los objetivos de esta Tesis.

Asimismo, debido a su capacidad para solubilizar solutos, los surfactantes pueden ser efectivos en la solubilización y extracción de analitos en matrices sólidas. La utilización de estos medios micelares, junto con la extracción asistida por microondas, se ha mostrado como un método rápido y eficaz para la

35

extracción de compuestos orgánicos en este tipo de muestras [104-106].

El estudio de la aplicación de esta nueva metodología para la extracción de derivados fenólicos se desarrolla en el Capítulo III de la presente Tesis, por lo que la misma se describirá extensamente en dicho capítulo.

En cuanto a las separaciones cromatográficas, se han utilizado disoluciones micelares acuosas como fases móviles en cromatografía líquida. Aunque este tipo de fases se emplearon originalmente en cromatografía en columna y en capa fina, posteriormente se han utilizado en cromatografía líquida de alta eficacia, generando un nuevo tipo de cromatografía denominada Cromatografía Líquida Micelar (MLC) [107,108]. La separación se consigue por la distribución del soluto entre las fases estacionaria, acuosa y micelar.

La Electroforesis Capilar (CE) se puede utilizar con fases micelares. El primer uso de tales fases se debe a Terabe, quien en 1984, denominó a esta técnica Cromatografía Micelar Electrocinética (MEKC) [109]. El éxito de esta técnica supuso extender la aplicación de la CE a moléculas y todo tipo de especies sin carga. De hecho, la MEKC se convirtió en una herramienta esencial en el campo de la separación de especies biológicas [110-112].

I.3. OBJETIVOS DEL TRABAJO

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

Se han elegido dos mezclas diferentes de derivados fenólicos: una de quince compuestos entre los se que incluyen clorofenoles, nitrofenoles y alquilfenoles, y otra más sencilla, con ocho compuestos, constituida fundamentalmente por clorofenoles. Esta última ha sido utilizada para el estudio del factor de preconcentración, en el capítulo II, y para el diseño experimental, en el capítulo III. Los surfactantes utilizados, del tipo polioxietilen alquil éteres, han sido:

- Polioxietilen 10 Lauril éter (POLE)
- Polioxietilen 9 Lauril éter (Polidocanol)
- Polioxietilen 6 Lauril éter
- Polioxietilen glicol monoalquil éter (Genapol X-080)

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

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

• Establecer las condiciones de separación adecuadas para las dos mezclas de fenoles estudiadas, utilizando la cromatografía líquida de alta

eficacia.

• Caracterización de los surfactantes utilizados en el estudio, es decir, determinación de su temperatura y concentración críticas.

• Establecer los parámetros asociados a la obtención del *punto de nube*: concentración de surfactante y fuerza iónica.

• Determinar la influencia de la naturaleza y concentración de surfactante, así como de la fuerza iónica, en la relación de los volúmenes de fase acuosa y fase rica en surfactante.

• Optimizar la metodología de extracción y preconcentración por *punto de nube* para muestras líquidas, determinando los valores óptimos de tiempo de equilibración, concentración de surfactante, pH de la disolución y fuerza iónica.

• Aplicación de la metodología de extracción y preconcentración por *punto de nube* a muestras de agua de mar y agua depurada, previamente acondicionadas con la mezcla de derivados fenólicos.

 Optimizar la extracción asistida por microondas, con medios micelares como extractantes para la extracción de derivados fenólicos en muestras de sedimentos marinos y muestras de suelo. La concentración y volumen de surfactante óptimos, así como el pH de la disolución, se establecerán previamente y se utilizará un diseño factorial para la optimización de las condiciones de irradiación del microondas, tiempo y potencia.

 Establecer la influencia de algunas de las características de la matriz, como el pH, el contenido en materia orgánica y la textura, en el proceso de extracción de los derivados fenólicos en muestras de suelo.

• Aplicar la extracción asistida por microondas con medios micelares a muestras de sedimentos marinos y muestras de suelo, previamente

enriquecidas con los derivados fenólicos, después de diferentes periodos de envejecimiento.

I.4. BIBLIOGRAFÍA

- 1. Environmental Protection Agency, Toxic Substance Control Act, USEPA, Washington, DC. (1979).
- C.A. Nilsson, A. Norstrom, K. Anderson and C. Rappe. Impurities in Commercial Products Related to Pentachlorophenol *In*: Pentachlorophenol: Chemistry, Pharmacology and Environmental Toxicology. K. R. Rao. Editor. Proc. Symp. Pensacola, Fla. June 27-29, Plenum Press, NY (1978).
- A.Creuzburg, Substances Preventing the Transfer of Non- persistent Viruses by Vectors. Patent. Germany (East). No. 102272 (From CAS: 83: 54566W). (1972).
- Ministry of Water, Land and Air Protection, British Columbia Government, Canadá. Página Web: http://wlapwww.gov.bc.ca/wat/wg/BCguidelines/chlorophenols/
- 5. H. Saito, M. Sudo, T. Shigeoka and F. Yamauchi, Envir. Toxic. and Chem. 10(2) (1991) 235.
- D. Liu, K. Thompson and K. L. E. Kaiser, Bull. Environ. Contam. Toxicol. 24 (1982) 130.
- 7. T.Shigeoka, T. Yamagata, T. Minoda and F. Yamauchi. Jpn. J. Toxicol. Environ. Health 34 (1988) 343.
- 8. Spectrum Laboratories, Página Web: http://www.speclab.com/compound
- P. A. Jones, Chlorophenols and their Impurities in the Canadian Environment: 1983 Supplement. EPS Report 3-EP-84-3. Environ. Protect. Program Dir. (1984).
- W. P. Cochrane, M. Lanouette and J. Singh. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 66(3) (1983) 804.
- Anon. (WHO). Pentachlorophenol Health and Safety Guide. IPCS International Program on Chemical Safety. Health and Safety Guide No. 19. WHO. ISBN 92-4-154341-8. (1989).
- 12. J. H. Carey and D. C. L. Lam. Pathways of Chlorophenols in the Fraser River Estuary. *In*: Anon. Pesticides, Research and Monitoring. Annual

Report. 1986-1987. Environment Canada. P 8. (1988) .

- 13. H. Fiedler, O. Hutzinger, C. W. Timms. Toxic. Environ. Chem. 29 (1990) 157.
- 14. W. F. Von Oettingen, Inst. Health Bull. 190 (1949) 193.
- Anon. (EPA). Ambient Water Quality Criteria for Chlorinated Phenols. USEPA. Report. EPA-440/5-80-032 (NTIS PB81 117434). (1980).
- 16. M. Grayson *et al.* Editors. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. 3rd Ed. J. Wiley and Sons, NY (also 5th Edition -1985), (1979).
- P. A. Jones, Chlorophenols and their Impurities in the Canadian Environment. Environ. Canad. Econom. and Tech. Rev. Rep't. EPS 3-EC-81-2. (1981).
- V. P. Kozak, G. V. Simsiman, G. Chesters, D. Stensby and J. Harkin. Chlorophenols. Reviews of the Environmental Effects of Pollutants. XI. Chlorophenols. USEPA. Rpt. EPA-600/1-79-012. 492 pp. NTIS: ORNL/EIS-128. (1979).
- Anon. (NCI). Bioassay of 2,4,6-Trichlorophenol for Possible Carcinogenicity. National Cancer Institute. Tech. Ser. Rept. Ser., No. 155. US HEW, Wash., DC (1979).
- Anon. (US EPA). EPA Position Document for the Rebuttable Presumption Against Registration of Products Containing 2,4,5-TCP. Fed. Regist. 43 (1978) 34026.
- P. H. Howard *et al.* A Study of Benzenepolycarboxylates, Chlorinated Naphthalenes, Chlorophenols, Silicones, and Fluorocarbons. US EPA Off. of Toxic Substances. Draft Report TR 73-567 (1973).
- 22. M. E. Tagatz, J. M. Ivey, J. C. Moore and M. Tobia. Journ. Toxic. & Environ. Health. 3 (1977) 501.
- Y. Hashimoto and Y. Nishiuchi. Effects of Herbicides on Aquatic Animals. *In*: Volume 2, Natural Products. Pesticide Chemistry: Human Welfare and the Environment. J. Miyamoto and P. C. Kearney. General Editors. Intern. Union of Pure and Applied Chemistry. Proc. 5th Int. Congress. Pesticide Chem. Kyoto, Japan. Aug. 29-Sept. 4. Pergamon Press, NY (1982).
- 24. D. Konasewich, W. Traversy and H. Zar. Great Lakes Water Quality. Status

Report on Organic and Heavy Metal Contaminants in Lakes Erie, Michigan, Huron and Superior Basins to the Implementation Committee of the Great Lakes Quality Board. Int. Joint Comm. Windsor. (1978).

- R. C. Pierce, The Aqueous Chlorination of Organic Compounds: Chemical Reactivity and Effects on Environmental Quality. NRCC No. 16450, ISSN 0316-0114. Associate Committee on Scientific Criteria for Environmental Quality (1978).
- R. L. Jolley, G. Jones, W. W. Pitt and J. E. Thompson. Chlorination of Organics in Cooling Waters and Process Effluents. *In*: R. L. Jolley. Editor. 1975. Proc. Conf. Envir. Impact. Water Chlor. Oak Ridge Nat. Lab., Tenn. 22-24 Oct. (1975).
- 27. W. C. Evans, Biochem. J. 122 (1971) 543.
- Anon. (USEPA). 1978. Ambient Water Quality Criteria Document. NTIS. EPA-440/5-80-042. Springfield, Va. (1980).
- G. B. Bacon, Bioaccumulation of Toxic Compounds in Pulpmill Effluents by Aquatic Organisms in Receiving Waters. Envir. Can. Ann. Rpt. CPAR Proj. No.675. Draft Rpt. No. M-79-76. (1978).
- 30. J. Kohli et al. Can. Journ. Biochem. 54 (1976) 203.
- Anon. (WHO). Guidelines for Drinking Water Quality. Vols. 1 & 2. World Health Organization. Geneva. (1984).
- J. C. Karapally, J. G. Saha and Y. W. Lee. Journ. Agric. Food Chem. 21 (1973) 811.
- J. Kohli, I. Weisgerber, W. Klein and F. Korte. Journ. Environ. Sci. Health (B) 11 (1976) 23.
- C. L. Garrett, Fraser River Estuary Study. Water Qual. Ser. Tox. Org. Cont. EPS, Pacific & Yukon Region, Envir. Can. (1980).
- R. H. Burttschell, A. A. Rosen, F. M. Middleton and M. B. Ettinger. Chlorine Derivatives of Phenol Causing Taste and Odour. Journ. Amer. Water Works. Assoc. 51 (1959) 205.
- J. Paasivirta, K. Heinola, T. Humppi, A. Karjalainen, J. Knuutinen, K. Mantykoski, R. Paukku, T. Piilola, K. Surma-Aho, J. Tarhanen, L. Welling, H.

Vihonen and J. Sarkka, Chemosphere 14 (1985) 468.

- B. Ahling and A. Lindskog. Emission of Chlorinated Organic Substances from Combustion. Inter. Conf. on the Recovery of Pulping Chemicals, Van. BC. Sept. 22-25. (1981) 281.
- P. Y. Lu, R. L. Metcalf and L. K. Cole. The Environmental Fate of 14Cpentachlorophenol in Laboratory Model Ecosystems. *In*: Pentachlorophenol: Chemistry, Pharmacology and Environmental Toxicology. K. R. Rao. Editor. Plenum Press, NY (Proc. Symp. Pensacola, Fla., June 27-29, 1977). (1978).
- G.Koss and W. Koransky. Pentachlorophenol in Different Species of Vertebrates After Administration of Hexachlorobenzene and Pentachlorobenzene. *In*: Pentachlorophenol: Chemistry, Pharmacology, and Environmental Toxicology. K. R. Rao. Editor. Plenum Press, NY (Proc. Symp., Pensacola, Fla.) June 27-29. (1978).
- M. R. Falk and M. J. Lawrence. Acute Toxicity of Petrochemical Drilling Fluid Components and Wastes to Fish. Envir. Can. Fish. and Marine Serv. Cent. Reg. Tech. Rept. Ser. Cent. 73-1. (1973).
- R. C. Dougherty and K. Piotrowska. Screening by Negative Chemical lonization Mass Spectrometry for Environmental Contamination with Toxic Residues: Application to Human Urines. Proc. Natl., Acad. Sci. USA 73 (1976) 1777.
- R. E. Duggan and M. B. Duggan. Pesticide Residues in Food. *In*: Edwards,
 C. A. Editor. Environmental Pollution by Pesticides. Plenum Press NY. (1973) 334.
- V. Zitko, O. Hutzinger and P. M. K. Choi. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 12 (1974) 649.
- 44. D. B. Harper and D. Banave. Pesticide Sci. 6 (1975) 159.
- P. M. McKee, R. P. Scroggins and D. M. Casson. Chlorinated Phenols in the Aquatic Environment. Scientific Criteria Document for Standard Development No. 2-84. IEC. Beak Consultants. Mississauga, Ont. For: Ontario Ministry of Environment. (1984).
- 46. L. G. Swain and D. G. Walton. Report on the 1987 Benthos and Sediment

Monitoring Program. Fraser River Estuary Monitoring. Fraser Port and Prov. of BC (1988).

- R. H. Pierce and D. Victor. The Fate of Pentachlorophenol in an Aquatic Ecosystem. *In*: Rao, K. R. Editor. Pentachlorophenol: Chemistry, Pharmacology and Environmental Toxicology. Proc. Symp., Pensacola, Fla. June 27-29. Plenum Press, NY (1978).
- R. H. Pierce, Fate and Impact of Pentachlorophenol in a Freshwater Ecosystem. EPA Report 600/3-70-063 (1978).
- 49. W. A. Harvey and A. S. Crofts. Hilgardia 21 (1952) 487.
- 50. R. D. Arsenault, Wood Pres. Assoc. Meet. Proc. 72 (1976) 122.
- 51. J. Paasivirta, J. Sarkka, T. Leskijarvi and A. Roos. Chemosphere. 9 (1980) 441.
- 52. L. F. Faas and J. C. Moore. J. Agric. Food Chem. 27(3) (1979) 554.
- J. Paasivirta, J. Sarkka, T. Leskijarvi and A. Roos. Chemosphere. 9 (1980)
 441.
- 54. L. F. Faas and J. C., J. Agric. Food Chem. 27(3) (1979) 554.
- 55. R.M. Behki, S.U. Khan, J. Agric. Food Chem. 39 (1991) 805.
- 56. L.G. Sultatos, Toxicol. Appl. Pharmacol. 86 (1986) 105.
- 57. L. Somasundaran, J.R. Coats, K.D. Racke, J. Environ. Sci. Health B. 24 (1989) 457.
- 58. A.K. Naidu, A.P. Kulkarni, Pestic. Biochem. Physiol. 41 (1991) 150.
- 59. M.P. Carver, P.E. Levi, J.E. Riviere, Pestic. Biochem. Physiol. 38 (1990) 245.
- 60. M. Frost, M.O. Abo-El-Seoud, Arch. Phytopathol. Plant Prot. 30 (1996) 261.
- Concise International Chemical Assessment, Document 20.
 Mononitrophenols (CICADS 20,2000), Página Web: http://www.inchem.org/documents/cicads/cicads/cicad_20.htm
- J.B. Lippincot, List ofWorldwide Hazardous Chemical and Pollutants, The Forum for Scientific Excellence, New York, (1990).
- 63. M.J. Rosen, "Surfactants and Interfacial Phenomena", New York, Wiley Interscience. (1989).

- 64. S.P. Moulik, Current Science. 71 (5) (1996) 368.
- R. Nagarajan, E. Ruckenstein, Separation Science and Technology. 16 (10) (1981) 1429.
- Y. Moroi, "Micelles: Theoretical aand Applied Aspects", Plenum Press, New York. (1992).
- W.L. Hinze, "Organized Surfactant Assemblies in Separation Science", American Chemical Society, Chapter 1 (1987).
- 68. P. Mukerjee, J.R. Cardinal, J. Phys. Chem. , 82 (1978) 1620
- 69. C. Tanford, J. Phys. Chem., 78 (1974) 2469
- 70. W.L. Courchene, J. Phys. Chem. 68 (1964) 1870.
- 71. D. Bendedouch, S.H. Chen, W.C. Koeler, J. Phys. Chem. 87 (1983) 2621.
- 72. K.S. Birdi, Prog. Colloid Polym. Sci. 70 (1985) 23.
- 73. Fotoc libro tema 10.
- E. Pramauro, E. Pelizzetti, "Surfactants in Analytical Chemistry, Applications of organized amphiphilic media", S.G. Weber (Ed), Elsevier, Amsterdam, (1996).
- K. Shinoda, T. Nakagawa, B. Tamamushi, T. Isemura, "Colloidal Surfactants", Acad. Press, New York. (1963).
- K. Kimata, K. Hosoya, T. Araki, N. Tanaka, E.R. Barnhart, L.R. Alexander, S. Sirimane, P.C. McClure, J. Grainger, G. Patterson, Anal Chem. 65 (1993) 2502.
- 77. N. Nishikido, Y. Moroi, R. Matuura, Bull. Chem. Soc. Jpn. 48 (1975) 1387.
- M.J. Rosen, A.W. Cohen, M. Dahanayake, X.Y. Hua, J. Phys. Chem. 86 (1982) 541.
- 79. A. Ray, G. Nemethy, J. Phys. Chem. 75 (1971) 809.
- 80. H. Watanabe, H. Tanaka, Talanta. 25 (1978) 585.
- 81. A. Helenius, K. Simons, Biochim. Biophys. Acta. 415 (1975) 29.
- J. Cross, Nonionic Surfactants, Chemical Analysis, Surfactant Science Series, vol. 19, Marcel Dekker (Ed), New York. (1987).
- C. Shöller, M. Wittwer, German Patents P. 605.973, P. 667.744, P. 694.178 to BASF, 30 Noviembre (1930).

- W.L. Hinze, E. Pramauro, Critical Reviews in Analitycal Chemistry. 24 (2) (1993) 133.
- N. Schönfeldt, "Surface Active Ethylene Oxide Adducts", Pergamon Press, New York. (1969).
- 86. A. Berthod, S. Tomer, J.G. Dorsey, Talanta. 55 (2001) 69.
- D. Myers, "Surfaces, Interfaces and Colloids: Principles and Applications", VCH, New York. (1991).
- 88. F.H. Quina, E.O. Alonso, J.P.S. Farah, J. Phys. Chem. 99 (1995) 11708.
- 89. E. Pramauro, A.B. Prevot, Pure and Appl. Chem. 67 (1995) 551.
- 90. F.M. Menger, J.M. Bonicamp, J. Am. Chem. Soc. 103 (1981) 2140.
- 91. J.H. Fendler, "Membrane Mimetic Chemistry", Wiley, New York. (1982).
- 92. H. Wennerstrom, B. Lindman, Physics Reports. 52 (1979) 2.
- D. Oakenfull, "Aggregation Processes in Solution", E.Wyn-Jones, J. Gormally, Eds., Elsevier, New York. (1983), Chapter 5.
- 94. E. Pelizzetti, E. Pramauro, Anal. Chim. Acta. 169 (1985) 1.
- 95. L.J. Cline Love, J.G. Habarta, J.G. Dorsey., Anal. Chem. 56 (1984) 1132.
- J. Hernández García, Z. Sosa Ferrera, A.J. Bermejo Martín-Lázaro, J.J. Santana Rodríguez, Analytical Letters. 27 (7) (1994) 1355.
- 97. G.L. Mcintire, Anal. Chem. 21 (1990) 257.
- 98. M.E. Díaz García, A. Sanz Medel, Talanta. 33 (1986) 255.
- A. Sanz Medel, M.M. Fernández, M. de la Guardia, J.L. Carrión, Anal. Chem. 58 (1986) 2161.
- 100. J.J. Santana, M. Gunshefski, J.D. Winefordner, Talanta. 39 (1992) 195.
- 101. A.J. Bermejo, J. Hernández, J.J. Santana, Fresenius J. Anal. Chem. 343 (1992) 509.
- V. De Giorgio, "Nonionic Micelles, in Physics of Amphiphiles: Micelles, Vesicles and Microemulsions", V. De Giorgio and M. Corti, Eds., North-Holland, Amsterdam. (1985),.
- N.M. van Os, J.R. Haak, L.A.M. Rupert, "Physico-Chemical Properties of Selected Anionic, Cationic and Nonionic Surfactants", Elsevier, Amsterdam. (1993).

2006

- 104. D.W. Armstrong, Separation and Purification Methods. 14 (2) (1985) 213.
- 105. S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichiwa, A. Tsuchiya, T. Ando, Anal. Chem. 56 (1984) 111.
- P.G. Righetti, "Capillary Electrophoresis in Analytical Biotechnology" P.G. Righetti (Ed) CRC Press, Boca Ratón, FL. (1996).
- 107. M.J. Sepaniak, A.C. Powell, D.F. Swalile, R.O. Cole, "Fundamentals of MECK, in Capillary Electrophoresis", P.D. Grossman and J.C. Colburn (Ed), Capt. 6, pp159-189, Academic Press Inc., New York. (1992).
- K. Otsuka, S. Terabe, "MECK, en Capillary Electrophoresis Guidebook", K. Altria (Ed), "Methods in Molecular Biology", 52, Capt. 12, pp 125-155, Humana Press Inc., New York. (1992).

CAPÍTULO II

EXTRACCIÓN EN MUESTRAS LÍQUIDAS

II.1. INTRODUCCIÓN

La base de la técnica de extracción por separación de fases deriva del fenómeno que presentan algunas disoluciones de surfactantes no iónicos. Estas disoluciones presentan turbidez cuando se calientan o enfrían en un rango estrecho de temperatura característico para cada surfactante. Posteriormente, se produce una separación de la disolución en dos fases isotrópicas: la fase rica en surfactante de menor volumen, la fase micelar, y la fase acuosa de mayor volumen, donde la concentración de surfactante es próxima a su concentración micelar crítica. Esta separación de fases es reversible, de manera que una inversión de las condiciones hace que las dos fases converjan para formar de nuevo una sola fase [1-4].

La temperatura a partir de la cual se produce la separación de fases se denomina temperatura crítica o temperatura de *punto de nube*. Esta temperatura depende de la concentración de surfactante en la disolución. Para que se produzca la separación de fases es necesario que la concentración de surfactante en la disolución supere la concentración mícelar crítica [5]. Si representamos gráficamente la temperatura a la que ocurre la separación de fases frente a la concentración de surfactante en disolución obtenemos un diagrama de fases. La curva obtenida se denomina curva de coexistencia y separa las dos regiones del diagrama: una en la que encontramos una sola fase (L) y la otra en la que coexistencia típica de un surfactante no iónico. Al punto mínimo de esta curva se le llama punto crítico, y a la temperatura y concentración de ese punto se les denomina temperatura y concentración críticas, respectivamente [4,6].

El fenómeno de separación de fases puede obtenerse en casi todas las disoluciones micelares, independientemente del tipo de surfactante, alterando las condiciones del medio. Esta separación es debida a la diferencia de densidades de las dos fases. La afinidad que presentan algunos solutos por la fase rica en

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblicteca Universitaria, 2006

51

surfactante permite extraerlos y preconcentrarlos en una sola etapa.

El mecanismo por el cual tiene lugar la separación de fases es poco conocido. Para 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 [7,8]. Otros sugieren que para dichos surfactantes el mecanismo de la separación de fases puede estar basado en un cambio en las interacciones micelares, las cuales son repulsivas a temperaturas bajas, pero predominantemente atractivas a temperaturas altas [9]. Otros autores 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 [10].



Figura II.1. Diagrama de fases típico de una solución acuosa de un surfactante no iónico.

La metodología de extracción por *cloud point* o *punto de nube* es bastante competitiva con los métodos convencionales para extraer y preconcentrar analitos y entre sus ventajas podemos destacar:

- No se utilizan disolventes orgánicos, por lo que disminuye el coste y la toxicidad del proceso de extracción.
- No existen problemas de saturación de los absorbentes como en la SPE. Si es necesario, se puede utilizar una mayor cantidad de surfactante en la disolución.
- En comparación con las otras técnicas, reduce considerablemente el tiempo que se necesita para extraer los analitos y no es necesario acondicionar la muestra previamente.

II.1.1. Temperatura de punto nube o cloud point

En la Tabla II.1 se encuentra una recopilación de las temperaturas de *cloud point* o *punto de nube* de algunos surfactantes polioxietilénicos. Además de la concentración de surfactante hay otros factores como son la naturaleza del surfactante, la adición de sales o de compuestos orgánicos, así como la presencia de otros surfactantes, que pueden modificar la temperatura a la que se produce el fenómeno de *punto de nube*, y hay que tenerlos en cuenta ya que juegan un importante papel en el proceso de separación.

• Naturaleza del surfactante.

Para una serie homóloga de surfactantes polioxietilénicos la temperatura de punto de nube aumenta a medida que disminuye la longitud de la cadena hídrocarbonada, y al aumentar la longitud de la cadena de oxietileno [21]. En la Tabla II.2 puede observarse que para surfactantes como el $C_{12}E_6$ y $C_{12}E_8$, que poséen 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 $C_{12}E_6$, vemos 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 si lo hace la masa molecular del surfactante, cuando se ramifica el grupo hidrofóbico o si se reemplaza el grupo hidroxilo terminal del grupo hidrofílico por un grupo metilo.

Surfactante	Temperatura (°C)	Ref.
C ₁₀ E ₆	59-63	11
	58	12
	60	13
	62.2	14
	63	15
C ₁₂ E ₆	50	11
	50.3	16
	51.3	17
	52.5	15
	53.2	18
	51.1	14
C12E8	75.5	19
	77	11
	78	15,18
	78.4	14
	79.2	20

Tabla II.1.	Temperaturas de punto	o de nube para diferentes
surfactante	s polioxietilénicos.	

Surfactante	Aditivo	Temperatura (°C)
C ₁₂ E ₄	Ninguno	0-1
	3 mM CTAC	> 85
	1 mM SDS	78-81
	5 mM SB-12	4-7
	Ninguno	32.2
C ₁₂ E ₅	1.3 mM DoPyCl	91
	CTAC (x = 0.025)	52
C ₁₂ E ₆	Ninguno	52
	0.04 M NaCO ₃	36
	1 M NaCl	41
	10 % (m/v) NaCl	31.8
C ₁₂ E ₈	Ninguno	74
	40 % Glicerol	62
	60 % Glicerol	43
C ₁₂ E ₂₄	Ninguno	> 100
	1.1 M NaCl	88
	0.15 M Fenol	25

Tabla II.2. Variaciones de la temperatura de *punto de nube* para diferentes surfactantes polioxietilénicos [4].

• 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 electrolitos como cloruros, sulfatos, carbonatos, etc., provoca una disminución de la temperatura a la cual se produce el fenómeno de *punto de nube*. Este efecto se conoce con el nombre de *"salting-out"*. Sin © Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

embargo, hay electrolitos como nitratos, yoduros, tiocianatos, etc., que producen el efecto contrario, *"salting-in"*, es decir, provocan un aumento de la temperatura de *punto de nube* [22-28]. En la Tabla II.2 se muestra el efecto de la adición de NaCl sobre algunos surfactantes.

• 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* [29]. Compuestos orgánicos polares, como alcoholes alifáticos o fenoles, disminuyen la temperatura de *punto de nube* [30,31]. Así, la presencia de fenol 0.15 M disminuye la temperatura de *punto de nube* del C₁₂E₂₄, superior a los 100°C, hasta 25 °C (Tabla II.2).

• Presencia de otros surfactantes.

Cuando la disolución contiene dos o más surfactantes no iónicos, la temperatura de *punto de nube* es una temperatura comprendida entre las temperaturas críticas de cada surfactante por separado, mientras que la adición de surfactantes iónicos eleva dicha temperatura, debido a que se forman micelas mixtas [35,36].

• Variación de la presión.

Un aumento de la presión causa un aumento de la temperatura del proceso de *punto de nube* [34,35].

Se puede considerar, por tanto, que es posible obtener una temperatura de *punto de nube* determinada, para una aplicación analítica concreta, seleccionando el surfactante adecuado, mezclando surfactantes o eligiendo un aditivo que varíe la temperatura en el sentido que nos interese.

II.1.2. Relación de fases

Existen una serie de parámetros que afectan a los volúmenes que se obtienen de cada una de las fases después de la separación de las mismas. Ésto tiene especial interés, ya que la relación de volúmenes entre la fase rica en surfactante y fase acuosa determina la preconcentración de los solutos después de su extracción. El factor de concentración, $C_{\rm F}$, viene dado por la relación $V_{\rm ac}/V_{\rm s}$, que es la relación entre el volumen original de fase acuosa y el volumen de la fase rica en surfactante [36,39]. Por tanto, cuanto más pequeño sea el volumen de fase rica en surfactante mayor será el factor de preconcentración. En general, el volumen de la fase rica en surfactante que se extrae después de la separación es reducido, lo cual justifica que los factores de preconcentración obtenidos por esta técnica sean elevados. Debido al reducido volumen de esta fase, es necesario establecer un volumen de la misma suficientemente alto como para que su manipulación no conduzca a errores, y que los resultados sean reproducibles. Por tanto, es necesario optimizar dicho volumen, al tiempo que se obtiene un factor de preconcentración adecuado, y tener en cuenta los factores que sobre él influyen. A continuación se describen los parámetros que afectan a la relación de fases.

Temperatura

Ésta debe estar siempre por encima de la temperatura de punto de nube para que se produzca la separación de fases. Sin embargo, un aumento considerable de la temperatura provoca la disminución del volumen de fase rica en surfactante debido a que se produce una deshidratación al romperse los puentes/enlaces de hidrógeno y la cantidad de agua en esta fase disminuye [10]. Esto supone una mayor preconcentración de los analitos.

• 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 [10].

• Efecto de la 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. Cuanto mayor sea la concentración de surfactante en la disolución, mayor será el volumen de fase rica en surfactante, con lo que el factor de concentración disminuirá [24,25]. Teniendo en cuenta que a mayor concentración de surfactante, mayor es la extracción, hay que elegir una concentración que nos permita extraer suficientemente los analitos, y que 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 en algunas aplicaciones se añaden pequeñas cantidades de disolvente (agua, metanol, etanol, etc.) para disminuir la viscosidad de dicha fase y facilitar su manipulación [38].

• Efecto de la naturaleza del surfactante.

La relación de fases depende de la estructura del surfactante; así, para una serie homóloga de surfactantes no iónicos con cadena polioxietilénica, el volumen de fase rica en surfactante aumenta con el aumento de la cadena oxietilénica y con la de la longitud de la cadena hidrocarbonada. Para obtener mejores factores de preconcentración hay que elegir surfactantes con pocas unidades oxietilénicas y de cadena corta. Sin embargo, también es importante la capacidad extractante, por lo que habrá que tener en cuenta si estos surfactantes son los más adecuados a la hora de extraer los solutos [40].

La fase rica en surfactante puede situarse en el fondo o en la superficie de la disolución dependiendo de las densidades relativas. Generalmente, la fase rica en surfactante es más densa que la fase acuosa, por lo que aquella se sitúa en el fondo (ej. Tritons, PONPEs). 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) [40].

• Efecto de la fuerza iónica.

Se ha observado que el volumen de la fase rica en surfactante no depende de la fuerza iónica [40]. 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.

II.1.3. Solubilización de solutos

٠.

Los solutos, que inicialmente están en fase acuosa, pueden ser extraídos en la fase rica en surfactante en diferente extensión, dependiendo de las interacciones especificas soluto-micela [39]. La Figura II.2 representa esquemáticamente el proceso de extracción por *cloud point* o *punto de nube*.



Figura II.2. Proceso de extracción por cloud point o punto de nube.

Los factores que pueden afectar a la solubilización de los solutos tendrán una gran influencia en los porcentajes de recuperación obtenidos al aplicar el proceso a la extracción de analitos y a su preconcentración. Los parámetros más importantes son:

• 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 [41].

• Temperatura de equilibración.

Tiene que ser siempre superior a la temperatura de *punto de nube*. Hay que tener en cuenta la elección de surfactantes con temperaturas de *punto de nube* no muy elevadas, ya que 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 añadir los aditivos necesarios para modificar su temperatura de *punto de nube*. Además, en el paso de centrifugación, una caída brusca de la temperatura podría provocar la disolución de parte de la fase rica en surfactante, lo que se traduciría en una pérdida en la eficiencia de la extracción. Pequeños cambios de la temperatura en el paso de centrifugación no suponen pérdidas, siempre que se mantengan separadas las dos fases. Por lo general, se elige una temperatura del orden de 15 a 20° C por encima de la temperatura de *punto de nube* [40].

• Concentración de surfactante.

Al aumentar la concentración de surfactante en disolución, el porcentaje de extracción de los solutos aumenta. Lógicamente, esta variación es más notable 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 concentración, ya

que aumenta el volumen de la fase rica en surfactante.

• Naturaleza del surfactante.

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, C₁₂E₁₀, que el Polidocanol, C₁₂E₉) 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 etilénicas 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. El mejor surfactante, desde el punto de vista de la extracción, será aquel que tenga pocas unidades etilénicas y cadenas hidrocarbonadas largas [40]. 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.

• Adición de sal.

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 [42]. Los analitos más polares se vuelven más insolubles en la disolución, por lo que su extracción mejora.

• pH de la disolución.

Este factor es importante 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 [40]. En el caso de los fenoles, es necesario disminuir el pH de la disolución a fin de que éstos se encuentren en su forma neutra. Sin embargo, para compuestos como los PCBs, PCDFs o PCDDs, que no presentan formas iónicas, el pH de la disolución no afecta a la extracción de los mismos.

II.1.4. Aplicaciones analíticas

La metodología CPE fue inicialmente presentada y utilizada por Hiroto Watanabe y sus colaboradores en Japón [43] para extraer iones metálicos como complejos metálicos hidrofóbicos. Posteriormente, Bodier utilizó la técnica para la extracción de biomoléculas hidrofóbicas [44]. Desde entonces, la técnica CPE se utiliza como paso previo para aislar y purificar proteínas y compuestos bioquímicos relacionados [45-48].

Más recientemente, la CPE ha sido aplicada a la extracción y preconcentración de compuestos orgánicos de interés medioambiental. Esta metodología se ha utilizado para diseñar métodos de extracción eficientes para una gran variedad de analitos, como paso previo a su determinación. Las ventajas que presenta esta técnica frente a las convencionales, basadas en la utilización de disolventes orgánicos, son:

• Aumento de la selectividad. Los medios micelares pueden ser muy selectivos en cuanto a los analitos que pueden quedar retenidos en su interior.

 Elevados factores de preconcentración. Esta característica se encuentra favorecida por los reducidos volúmenes de fase rica en surfactante, en la que quedan retenidos los analitos, que originalmente se encuentran en un volumen de disolución acuosa mucho mayor.

• Mayor seguridad en el trabajo y menores costes. Se utiliza un pequeño volumen de surfactante frente a los grandes volúmenes de disolventes orgánicos que utilizan los métodos convencionales. Además,

los surfactantes son menos tóxicos que los disolventes orgánicos.

• Compatibilidad de la fase de surfactante que se obtiene tras el proceso de extracción, con las fase móviles generalmente empleadas en cromatografía líquida de alta eficacia.

En la Tabla II.3 se muestran algunas de estas aplicaciones.

Compuestos	Matriz	Surfactante	Ref.
	Agua	1% SDSA	49
	Agua	Genapol X-080	36
PAHs	Agua	0.1% Triton X-114	50
	Cenizas	0.5% Triton X-114	50
	Partículas de humo	0.5% Triton X-114	50
PCBs	Agua de mar	2% Genapol X-080	51
	Agua de mar	2% Brij 30 ó Brij 9 7	52
PCDFs	Agua de mar	2% Genapol X-080 ó Brij 56	53
PCDDs	Suero humano	12% Triton X-100	42
Pesticidas organofosforados	Agua de río	0.25% Triton X-114	54,55
Fungicidas	Agua de río	0.25% Triton X-114	37
Clorofenoles	Agua	C ₈ E ₃	40
	Agua de río	0.5% Triton X-114	56
Ácidos húmicos y fúlvicos	Agua de río	4% Triton X-100	57

Tabla II.3. Aplicaciones analíticas de la metodología CPE.

Los resultados obtenidos indican claramente que el uso de soluciones micelares de diferentes surfactantes no iónicos en la metodología CPE es muy efectivo en la extracción y preconcentración de analitos. Basándose en estos resultados, muchos autores concluyen que la técnica CPE ofrece una alternativa a la extracción convencional con disolventes orgánicos debido a su gran eficiencia de extracción.

II. 2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

II. 2. 1. CARACTERIZACIÓN DE LOS SURFACTANTES

Los medios micelares han sido ampliamente utilizados en el campo de los métodos de separación, ya que permiten extraer y preconcentrar los analitos en una sola etapa. La propiedad de solubilizar compuestos de diferente naturaleza ha permitido aprovechar esta característica para desarrollar nuevos procesos de extracción sin el empleo de disolventes orgánicos. Además, las concentraciones que presentan los analitos de interés en muestras medioambientales, como sucede con los fenoles en agua de mar, puede requerir una etapa previa de preconcentración, que permita alcanzar los límites de detección necesarios. Por ello, a la hora de utilizar los surfactantes como extractantes se debe tener en cuenta aquellos parámetros que pueden afectar а la extracción y preconcentración. En función del tipo de surfactante, los parámetros que controlan la separación de fases y, por tanto, la extracción, pueden ser diferentes. Estos parámetros son, fundamentalmente, la concentración micelar crítica, la temperatura crítica a la cual se produce la separación de las fases y la relación entre los volúmenes de fase rica en surfactante y la fase acuosa. A continuación se estudian dichos parámetros.

II. 2. 1. 1. Concentración micelar crítica

Los surfactantes tienen la capacidad de formar agregados denominados micelas cuando se encuentran en disolución. Este proceso tiene lugar cuando la concentración del surfactante en la disolución supera un determinado valor. La concentración a partir de la cual se forman las micelas se denomina *concentración micelar crítica*. Esta concentración es característica para cada surfactante y depende en gran medida de las condiciones del medio. Este parámetro puede determinarse mediante la utilización de diferentes técnicas físico-químicas; en nuestro caso la técnica utilizada ha sido la conductimetría. El valor de dicho parámetro se ha calculado mediante la representación gráfica de la conductividad de la disolución frente a la concentración de surfactante en disolución. El procedimiento seguido para determinar la conductividad de cada surfactante se explica en la Parte Experimental.

Los valores de la *concentración micelar crítica* para cada uno de los surfactantes estudiados se muestran en la Tabla II.4. Hay que tener en cuenta que la *concentración micelar crítica* obtenida se utiliza como valor de referencia, pero se trabaja siempre con concentraciones dos o tres veces superiores a la misma, como mínimo.

Surfactante	Concentración micelar crítica (mol.L ⁻¹)
Polioxietilen 10 Lauril éter (POLE) ^a	6.4.10 ⁻⁵
Polioxietilen 9 Lauril éter (Polidocanol)	6.9.10 ⁻⁵
Polioxietilen 6 Lauril éter	6.8.10 ⁻⁵
Genapol X-080ª	5.0.10 ⁻⁵

 Tabla II.4.
 Valores de la concentración micelar critica de los diferentes surfactantes estudiados.

^a Ref. [58]
II. 2. 1. 2. Temperatura crítica

Cuando se modifica la temperatura de la disolución en la que se encuentra un surfactante no iónico se produce la separación de dicha disolución en dos fases isotrópicas, una rica en surfactante y otra acuosa. La separación que se produce mediante este proceso se denomina *separación por punto de nube* y la temperatura a la cual se produce, *temperatura de punto de nube* o *temperatura crítica*. Los surfactantes estudiados en la presente Tesis son de tipo polioxietilénico y se caracterizan por poseer temperatura críticas superiores a la temperatura ambiente.

La temperatura a la cual se produce la separación de fases se considera como aquella en la que la disolución se vuelve turbia. Si la concentración de surfactante en la disolución es pequeña es posible que no se forme una fase completa, sino que solo aparecerán unas pequeñas gotas en la disolución. A medida que la concentración de surfactante en la disolución aumenta aparecerán las dos fases. Para que éstas queden perfectamente separadas es necesario centrifugar la disolución, cuidando que la temperatura no descienda por debajo de la temperatura crítica. En tal caso, las dos fases volverían a unirse, puesto que el proceso es reversible.

La temperatura a la que se observa el *punto de nube* depende, principalmente, de la concentración de surfactante en disolución. Los diagramas de fase, donde representamos la temperatura a la que ocurre la separación de fases frente a la concentración de surfactante en disolución, nos permiten obtener la temperatura crítica para cada surfactante. En estos diagramas de fases se observa una zona en la que predomina una sola fase (L) y otra en la que se observa la existencia de dos fases (2L). La curva que separa las dos zonas se denomina "curva de coexistencia" o "curva de codisolución". El punto mínimo de esta curva es el punto crítico, y la temperatura y concentración a la que ocurre se les denomina "temperatura crítica" (Tc) y "concentración crítica" (Cc), respectivamente. La Figura II.3 recoge las curvas de codisolución de los surfactantes estudiados. Para los surfactantes polioxietilénicos, $C_{12}E_n$, a medida que aumenta el número de unidades oxietilénicas en la molécula de surfactante, aumenta la temperatura crítica del mismo. La curva del Genapol X-080, a partir de una concentración del 2 % (v/v), está situada entre la del $C_{12}E_6$ y el $C_{12}E_9$.



Figura II.3. Diagramas de fases para los surfactantes estudiados.

Es posible modificar la temperatura crítica de un surfactante añadiendo determinadas sustancias a la disolución, como sales, alcoholes, etc., o añadiendo otros surfactantes. De esta manera es posible trabajar con cualquier surfactante puesto que podemos modificar la temperatura crítica del mismo, en el sentido que nos convenga, añadiendo un aditivo adecuado. En nuestro caso se ha utilizado NaCl como modificador de la temperatura crítica, puesto que algunos de los surfactantes estudiados poseen valores relativamente altos de este parámetro.

En la Tabla II.5 se recogen las temperaturas críticas para cada surfactante estudiado en presencia de NaCl al 5 % (m/v) y sin la presencia de esta sal. Se observa que la adición de NaCl disminuye la temperatura de *punto de nube* considerablemente, lo cual permite trabajar en un rango de temperaturas más bajo. Esto es particularmente útil cuando se utiliza la metodología de extracción por *punto de nube*, ya que es más fácil mantener las dos fases separadas si la temperatura crítica es menor.

	Temperatura crítica (ºC)		
Surractante	Sin NaCl	5 % NaCl	
Polioxietilen 10 Lauril éter (POLE)	95.0ª	75.0 ^b	
Polioxietilen 9 Lauril éter (Polidocanol)	86.6	65.0	
Polioxietilen 6 Lauril éter	60.0	50.0	
Genapol X-080	75.0ª	65.0	

 Tabla II.5.
 Valores de la temperatura crítica de los diferentes surfactantes estudiados.

^a Ref. [58]; ^b 7.5 % NaCl

II. 2. 1. 3. Relación de fases

Otra ventaja de los procedimientos de extracción basados en la utilización de surfactantes son los elevados factores de preconcentración que se pueden conseguir. Este hecho se ve favorecido por los reducidos volúmenes de fase rica en surfactante en que quedan retenidos los analitos que originalmente se encontraban en la disolución acuosa, con un volumen mucho mayor. La relación de los volúmenes de la fase rica en surfactante y de la fase acuosa, que se

obtiene después de la separación, determina la preconcentración de los solutos después de su extracción. Este factor viene determinado por el cociente entre el volumen inicial de la disolución acuosa y el volumen de la fase rica en surfactante.

Para determinar la relación de dichos volúmenes se calientan disoluciones de diferentes concentraciones de cada surfactante, a una temperatura entre 10 y 15°C por encima de su temperatura crítica, y, después de la separación de las fases, se mide el volumen de fase rica en surfactante. En la Tabla II.6 se muestran estos volúmenes, en función de la concentración, para los cuatro surfactantes estudiados. En la misma Tabla se presentan también la relación entre los volúmenes de las fases y el factor de preconcentración. Estos resultados se han obtenido añadiendo un 5 % (m/v) de NaCl a la disolución de cada uno de los surfactantes, excepto en el caso del POLE, que se ha utilizado un 7.5 %. Los rangos de concentración de surfactante analizados son diferentes para cada surfactante, puesto que para los más polares la concentración mínima para observar la dos fases era un 1%. A pesar de esta pequeña diferencia, se observa que, en general, los mejores factores de preconcentración los proporciona el surfactante menos polar, el $C_{12}E_6$, ya que, con este surfactante se observa el fenómeno de separación de fases con una concentración menor, con lo que el volumen de fase rica en surfactante es más pequeño. Los resultados del Genapol X-080 se encuentran entre los del C12E6 y los del Polidocanol. Los valores obtenidos con el POLE son ligeramente peores que los demás.

Como se comentó en la introducción a este capítulo, hay otros factores, además de la naturaleza del surfactante y su concentración, que pueden influir en el volumen obtenido de fase rica en surfactante. Entre estos factores se encuentran la temperatura y tiempo de calentamiento y la fuerza iónica del medio. Cuando se trabaja con una concentración dada de surfactante, el volumen de fase rica en el mismo puede disminuir al aumentar la temperatura y el tiempo de equilibración [40]. Este fenómeno puede deberse a una deshidratación de las micelas. Así, cuando la temperatura aumenta, la cantidad de agua decrece y el volumen de dicha fase disminuye. Este mismo proceso de deshidratación ocurre cuando se aumenta el tiempo de calentamiento.

Surfactante ^a	Concentracion % (v/v)	Volumen de fase rica en surfactante	Vac/Vs	Factor de preconcentración
<u>.</u>	1	0.4	24	25
	3	0.6	15.7	16.7
	5	1	9	10
(POLE)	8	1.4	6.1	7.1
	10	1.8	4.5	5.6
	1	0.2	49	50
	2	0.4	24	25
C₁₂E₃ (Polidocanol)	3	0.6	15.7	16.7
	5	0.8	11.5	12.5
	7.5	1	9	10
	0.5	0.1	99	100
	0.75	0.2	49	50
C ₁₂ E ₆	1	0.3	32.3	33.3
	2.5	0.4	24	25
	5	0.8	11.5	12.5
	0.5	0.2	49	50
	1	0.4	24	25
Genapol X-080	3	0.6	15.7	16.7
	5	0.8	11.5	12.5
	7.5	1.4	6.1	7.1

 Tabla II.6..
 Volúmenes de las fases obtenidas con los diferentes surfactantes estudiados y sus factores de preconcentración.

^a Con un 5 % (m/v) de NaCI, excepto en el POLE, en el que se utilizó un 7.5 % (m/v).

2006

Biblioteca

por ULPGC.

realizada

Digitalización

los autores.

© Del documento.

Con objeto de investigar la influencia de estos parámetros en el proceso, se utilizó el Genapol X-080 con una concentración del 3 % (v/v) y se midió el volumen de fase rica en surfactante obtenido, aplicando un rango de temperaturas de calentamiento entre 80 y 100 °C. También se aplicaron diferentes tiempos para obtener la separación de fases, entre 10 y 30 minutos. En general, se encuentra que dentro del intervalo de temperaturas y tiempos estudiados los volúmenes de fase rica en surfactante varían entre 0.4 y 0.6 mL.

Para determinar el efecto de la fuerza iónica se modificó la concentración de NaCl presente en la disolución de Genapol X-080, en las condiciones experimentales, de un 5 a un 10 % (m/v). Los resultados obtenidos indican que un aumento de la fuerza iónica del medio no tiene influencia en el volumen final de la fase rica en surfactante. Sí se aprecia, no obstante, que una adición de sal facilita la separación de las dos fases.

II. 2. 2. OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN POR PUNTO DE NUBE

La metodología de *punto de nube* resulta eficaz para la extracción y preconcentración de analitos de interés medioambiental, ya que permite su extracción y preconcentración en una sola etapa, como paso previo a su determinación. Esta metodología puede ser una alternativa válida con relación a otras técnicas de extracción convencionales, ya que proporciona un aumento en la sensibilidad del método, al conseguir factores de preconcentración elevados, además de mayor seguridad en el trabajo, puesto que se eliminan los disolventes orgánicos del proceso, y se disminuyen los costes. El proceso de extracción por *punto de nube* viene determinado por diferentes factores que pueden afectar a la solubilización de los solutos. Estos factores tienen una gran influencia en los porcentajes de recuperación obtenidos al aplicar el proceso a la extracción de los analitos y a su preconcentración. Los parámetros más importantes son el tiempo y la temperatura de equilibración, la naturaleza y concentración del surfactante, la

fuerza iónica del medio y el pH. Estos factores fueron optimizados y la metodología de *punto de nube* fue aplicada a diferentes tipos de muestras de agua.

II. 2. 2. 1. Tiempo de equilibración

Para la optimización del proceso de extracción es preciso investigar el tiempo necesario para que se produzca la interacción entre el soluto y la micela, es decir, el tiempo de equilibración. Dependiendo del tipo de soluto y de surfactante se necesitará más o menos tiempo para que se produzca la solubilización del analito en el interior de la micela. La temperatura utilizada para la optimización del tiempo de equilibración fue siempre superior a la temperatura crítica en 10-15°C. Para cada surfactante en estudio se utilizó una concentración del mismo diferente, ya que sus características no son las mismas. Por esta misma razón, el contenido en NaCI de la disolución también fue diferente para cada surfactante.

En la Figura II.4 se muestra la variación de los porcentajes de recuperación en función del tiempo de equilibración para algunos derivados fenólicos utilizando Genapol X-080 como extractante. Para este estudio se utilizó una concentración de dicho surfactante del 2 % (v/v) y un 3.5 % (m/v) de NaCI. En dicha figura se observa que, en general, los analitos más hidrofóbicos se extraen mejor que los más polares. Para estos analitos, un tiempo de 20 minutos parece ser el tiempo óptimo, ya que a partir de este momento las recuperaciones disminuyen ligeramente. Para los menos polares, a partir de 20 minutos las recuperaciones permanecen prácticamente constantes. Se eligió un tiempo de 20 minutos las recuperaciones de ser el más adecuado, ya que este tiempo es el que permite una mejor extracción de los analitos que peor se extraen, los más polares.

Para la optimización del tiempo de equilibración en el caso del POLE se utilizó una concentración de surfactante del 3 % (v/v) y de NaCl un 5 % (v/v). En este caso el intervalo de tiempos estudiados fue de 10 a 30 minutos. La Figura II.5 muestra los resultados para este surfactante, donde se observa que los porcentajes de recuperación varían prácticamente de la misma forma para todos los analitos, y que para los analitos más polares se encuentran recuperaciones más bajas. También se observa que al aumentar el tiempo de equilibración entre 25 y 30 minutos se producen mejoras en el rendimiento de la extracción. Se eligió un tiempo de equilibración de 25 minutos para continuar la optimización de los parámetros de la extracción con este surfactante.

Respecto a los otros surfactantes estudiados, el Polidocanol y el $C_{12}E_6$, en sus correspondientes condiciones, los resultados obtenidos se muestran en las Figuras II.6 y II.7. En ellas puede observarse que, si bien en el caso del Polidocanol los porcentajes de recuperación disminuyen a medida que aumenta el tiempo de equilibración, para el $C_{12}E_6$ permanecen prácticamente constantes al variar dicho parámetro. Para ambos surfactantes se eligió un tiempo de equilibración de 8 minutos como el más adecuado para los analitos en estudio.



Figura II.4. Efecto del tiempo de equilibración en la recuperación de derivados fenólicos utilizando Genapol X-080 como extractante.



Figura II.5. Efecto del tiempo de equilibración en la recuperación de derivados fenólicos utilizando POLE como extractante.



Figura II.6.. Efecto del tiempo de equilibración en la recuperación de derivados fenólicos utilizando Polidocanol como extractante.



Figura II.7. Efecto del tiempo de equilibración en la recuperación de derivados fenólicos utilizando $C_{12}E_6$ como extractante.

II. 2. 2. 2. Naturaleza del surfactante

Como se indicó en la Introducción de este capítulo, la naturaleza del surfactante utilizado juega un papel muy importante en la capacidad del mismo para extraer los analitos, dependiendo de la fortaleza de la interacción solutomicela. Con la finalidad de investigar el efecto de este parámetro en la eficacia de la extracción se utilizaron los surfactantes con estructura molecular similar, POLE, Polidocanol y $C_{12}E_6$, ya que el Genapol X-080 presenta ciertas diferencias respecto a los otros. Los surfactantes elegidos para realizar este estudio poseen la misma cadena alquílica pero diferente número de unidades oxietilénicas.

En la Figura II.8 se muestra la variación de los porcentajes de recuperación de cuatro derivados fenólicos, de diferente polaridad, con los tres surfactantes investigados.

Los resultados obtenidos muestran que, para este tipo de surfactantes con

la misma cadena alquílica, la capacidad extractante disminuye al aumentar la polaridad del surfactante, es decir, al aumentar el número de unidades oxietilénicas. Los valores obtenidos para los otros derivados fenólicos muestran la misma tendencia, es decir, los mejores resultados se obtienen con el $C_{12}E_6$, el surfactante más hidrofóbico.



Figura II.8. Influencia de la naturaleza del surfactante en la eficacia de la extracción.

II. 2. 2. 3. Concentración de surfactante

Al aumentar la concentración de surfactante en disolución el porcentaje de extracción de los solutos aumenta. Sin embargo, en la práctica esta concentración no debe ser muy grande, ya que supondría aumentar el volumen de la fase rica en surfactante y la disminución de los factores de preconcentración. En la Figura II.9 se representa la variación en los porcentajes de recuperación en función de la concentración de surfactante y de la naturaleza del mismo para analitos de diferente polaridad.



Figura II.9. Variación del porcentaje de recuperación de diferentes derivados fenólicos en función del tipo de surfactante y de su concentración.

En todos los casos se observa que el porcentaje de recuperación de los derivados fenólicos aumenta con la concentración de surfactante, pero a partir de un 3% del mismo la recuperación es prácticamente constante. El aumento inicial es más significativo para los compuestos polares, (Fig. II.9a), que para los más hidrofóbicos (Fig. II.9b). Estas diferencias se deben a que los analitos más polares se extraen peor con concentraciones de surfactante pequeñas, mientras que los más hidrofóbicos se extraen bien, incluso a concentraciones bajas de surfactante.

Para todos los analitos los porcentajes de recuperación aumentan al disminuir la polaridad del surfactante, es decir, al disminuir el número de unidades oxietilénicas en la molécula del mismo. El comportamiento del Genapol X-080 está entre el del POLE y el Polidocanol cuando se extraen los analitos más polares. Sin embargo, para los más hidrofóbicos los porcentajes obtenidos con este surfactante son superiores a los obtenidos con los otros.

En principio, una concentración del 5 % (v/v) permitiría una extracción óptima de los analitos. Sin embargo, cuando se utiliza esta concentración de POLE la resolución de los picos en el cromatograma no es satisfactoria, debido a la viscosidad de la fase rica en surfactante, por lo que decidimos utilizar una concentración menor de este surfactante, 4 % (v/v), para el resto del estudio y para las aplicaciones analíticas. Para el surfactante $C_{12}E_6$, puesto que se obtienen porcentajes de recuperación bastante satisfactorios, incluso para los analitos más polares, se eligió una concentración de un 1 % (v/v) con objeto de conseguir un mayor factor de preconcentración.

II. 2. 2. 4. pH de la disolución

La influencia de este parámetro en la eficacia de la extracción va a depender de si los analitos que van a ser extraídos presentan diferentes características en forma ácida o básica. Las moléculas neutras interaccionan mejor con las micelas del surfactante que las formas iónicas, por lo que el pH de la disolución puede afectar a la mayor o menor solubilización de dichos analitos por

parte del surfactante. El rango de pKa de los fenoles estudiados se encuentra aproximadamente entre 4 y 10, por tanto, es necesario disminuir el pH de la disolución a fin de que éstos se encuentren en su forma neutra. Además, hay que considerar que las disoluciones de los surfactantes poseen un pH en torno a 5.

Para estudiar la influencia del pH de la disolución en la eficacia de la extracción, se añadió un 1 % de ácido acético puro a las disoluciones de los surfactantes antes de proceder a la extracción de los analitos. De esta manera se consigue bajar el pH de la disolución hasta 2.5, con lo que nos aseguramos de que todos los fenoles están en forma neutra.

En la Figura II.10 se muestran los porcentajes de recuperación obtenidos con el Genapol X-080 cuando se modifica el pH de la disolución.



Figura II.10. Influencia de la modificación del pH de la disolución de Genapol X-080 en los porcentajes de recuperación de los derivados fenólicos.

En general, como era de esperar, los resultados son mejores cuando la extracción se realiza a pH ácido; incluso, para algunos analitos, como el 2,4-DNP y el 4,6-DNOC, se consiguen unos porcentajes de recuperación que duplican a los obtenidos sin modificar el pH. Hay que tener en cuenta que, precisamente, estos compuestos son los que poseen los pKa más bajos.

Sin embargo, cuando el extractante es el POLE, la extracción de los derivados fenólicos a pH ácido no mejora respecto a los resultados obtenidos cuando el pH no ha sido modificado. En la Figura II.11 se muestran los porcentajes de recuperación obtenidos con este surfactante y se puede observar que no hay cambios significativos en la recuperación de los diferentes fenoles con el pH. En este caso, la interacción soluto-micela no se ve favorecida por una reducción del pH.



Figura II.11. Influencia de la modificación del pH de la disolución de POLE en los porcentajes de recuperación de los derivados fenólicos.

II. 2. 2. 5. Fuerza lónica

La adición de electrolitos como cloruros, sulfatos, carbonatos, etc., a la disolución de surfactante provoca una disminución de la temperatura a la cual se produce el fenómeno de *punto de nube*. Este hecho es importante si la temperatura crítica del surfactante utilizado en la extracción es muy alta. Asimismo, la adición de sales provoca un aumento de la densidad de la fase acuosa, lo que facilita el proceso de separación de las fases y la manipulación de las mismas. Estas dos ventajas son suficientes como para añadir un electrolito a la disolución del surfactante en el proceso de extracción.

La utilización del NaCl permite reducir considerablemente la temperatura crítica de los surfactantes estudiados, como se describió en la sección II.2.1, Caracterización de los surfactantes.

Con objeto de establecer la concentración más adecuada de esta sal para realizar el proceso de extracción con cada surfactante, se estudió la influencia de diferentes concentraciones de NaCl en los porcentajes de recuperación de los derivados fenólicos. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras II.12 a II.15. En todos los casos los valores obtenidos indican que al aumentar la concentración de sal en la disolución mejora la extracción de los analitos. El Genapol X-080 y el POLE muestran variaciones en la recuperación más acusadas que los otros dos surfactantes, siendo éstas más importantes para los analitos más polares. En el caso del POLE, a partir de un 10 % de sal hay un descenso brusco en los porcentajes de recuperación, pero creemos que no se debe a que los analitos no se extraigan bien con este porcentaje, sino a que la fase rica en surfactante posee una viscosidad muy alta, con lo que su manipulación se hace más difícil y, por tanto, los errores en los porcentajes de recuperación sean posiblemente mayores. Sin embargo, este mismo porcentaje de NaCI en disolución favorece la extracción de analitos y la manipulación de la fase rica en surfactante en el caso del Polidocanol.

81



Figura II.12. Influencia de la fuerza iónica en los porcentajes de recuperación de los derivados fenólicos utilizando Genapol X-080 como extractante.



Figura II.13. Influencia de la fuerza iónica en los porcentajes de recuperación de los derivados fenólicos utilizando POLE como extractante.



Figura II.14. Influencia de la fuerza iónica en los porcentajes de recuperación de los derivados fenólicos utilizando Polidocanol como extractante.



 $\label{eq:Figura II.15.} Figura II.15. Influencia de la fuerza iónica en los porcentajes de recuperación de los derivados fenólicos utilizando C_{12}E_6 como extractante.$

En atención a los resultados experimentales obtenidos anteriormente, se establecieron las condiciones más idóneas para cada surfactante para su utilización en los procesos de extracción y preconcentración de fenoles, mediante la metodología de *punto de nube*. Estas condiciones se muestran en la Tabla II.7.

	Genapol X-080	POLE (C ₁₂ E ₁₀)	Polidocanol (C ₁₂ E ₉)	C ₁₂ E ₆
Concentración de surfactante (%, v/v)	3	4	3	1
Concentración de NaCl (%, m/v)	6	10	12.5	12.5
Tiempo de equilibración (min)	20	25	8	8
Factor de preconcentración	5	5	5	20

 Tabla II.7.
 Condiciones óptimas para la extracción y preconcentración de fenoles mediante la metodología de *punto nube*.

II. 2. 3. PARÁMETROS ANALÍTICOS Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los apartados anteriores, para establecer las características analíticas del método que nos permita la determinación de una mezcla de compuestos fenólicos, basada en la extracción y preconcentración con un medio micelar, se realizó un estudio estadístico del mismo con seis muestras acondicionadas con la mezcla de los derivados fenólicos. Estas muestras fueron sometidas al proceso completo de extracción por *punto de nube* con los cuatro surfactantes estudiados, y a su separación y determinación posterior por cromatografía líquida de alta resolución con detección UV. Las Figuras II.16 y II.17 muestran los cromatogramas obtenidos para la mezcla de fenoles utilizando Genapol X-080 y C₁₂E₆ como extractantes.



Figura II.16. Cromatograma del extracto obtenido al aplicar la extracción por *punto de nube* utilizando Genapol X-080 como extractante.



Figura II.17. Cromatograma del extracto obtenido al aplicar la extracción por punto de nube utilizando $C_{12}E_6$ como extractante.

En dichos cromatogramas se observa que las separaciones entre picos son suficientemente adecuadas para cuantificar los diferentes analitos en un tiempo adecuado de análisis. Además puede comprobarse que las señales del Genapol X-080 y del $C_{12}E_6$, al igual que los otros surfactantes utilizados, se encuentran al principio del cromatograma, por lo que no interfieren en los picos de interés.

	Recuperación (%) ^a			
Analito	Genapol X-080	POLE (C ₁₂ E ₁₀)	Polidocanol (C ₁₂ E ₉)	C ₁₂ E ₆
PH	40.5	68.1	63.9	65.7
4-NP	59.9	85.2	81.4	74.8
2,4-DNP	54.5	81.6	76.7	64.1
PC	53.7	74.6	77.1	66.0
2-NP	54.0	77.3	73.4	61.4
2CP	51.1	77.9	81.8	91.0
4CP	ND	93.0	83.8	109.0
2,4-DMP	59.2	72.5	87.8	75.0
4,6-DNOC	66.8	86.0	86.4	82.5
4-CMC	79.6	95.5	91.4	100.0
2,4,6-TMP	51.4	53.5	85.2	89.0
2,4-DCP	76.8	97.8	89.9	99.5
4-C3,5-DMP	81.5	96.4	92.4	101.6
2,4,6-TCP	88.5	98.6	96.2	95.1
PCP	93.0	110.3	90.6	102.1

 Tabla II.8.
 Recuperaciones obtenidas de los fenoles tras aplicar la extracción por punto de nube utilizando los diferentes surfactantes estudiados.

^a Valor promedio de seis determinaciones; ND: no determinado.

En la Tabla II.8 se presentan los resultados promedio de las recuperaciones obtenidas para los derivados fenólicos con las seis muestras después de someterlas al proceso de extracción, preconcentración y

determinación, según las condiciones optimizadas para cada surfactante, con una concentración de 100 μ g-L⁻¹ de cada uno de los fenoles. Los valores obtenidos para los analitos más hidrofóbicos, excepto en el caso del 2,4,6-TMP, son mejores que los que se obtienen con los fenoles más polares. Los surfactantes que proporcionan mejores resultados son el polidocanol y el C₁₂E₆, es decir, los mejores porcentajes de recuperación se obtienen con los surfactantes más hidrofóbicos, incluso para los analitos más polares, con recuperaciones superiores al 80 %.

Analito	Genapol X-080	POLE (C ₁₂ E ₁₀)	Polidocanol (C ₁₂ E ₉)	C ₁₂ E ₆
PH	5.4	6.6	8.2	7.4
4-NP	4.7	5.3	3.4	5.3
2,4-DNP	5.4	6.2	7.4	6.2
PC	6.4	4.6	9.0	4.6
2-NP	4.8	6.4	8.5	6.4
2CP	7.1	7.7	11.0	7.2
4CP	_ a	8.2	17.0	6.2
2,4-DMP	5.4	6.4	5.0	6.4
4,6-DNOC	3.9	7.6	5.1	6.7
4-CMC	3.8	5.8	6.6	4.3
2,4,6-TMP	6.2	7.3	8.9	7.3
2,4-DCP	5.8	5.0	6.9	7.3
4-C3,5-DMP	6.1	4.9	6.4	2.3
2,4,6-TCP	5.9	7.1	6.6	7.7
PCP	4.7	4.3	6.7	5.3

 Tabla II.9.
 Desviación estándar obtenida tras aplicar el método de extracción por punto de nube utilizando los surfactantes estudiados.

^a No detectado.

Los valores obtenidos de la desviación estándar relativa RSD (%), Tabla II.9, muestran que éstas oscilan entre un 4 y un 9 %, a excepción de los valores obtenidos para el 2-CP y el 4-CP con Polidocanol. Hay que destacar que la

precisión obtenida en presencia de un medio micelar es comparable, e incluso superior, a otros valores encontrados en la bibliografía para la determinación de fenoles en muestras acuosas [59].

		LOD	(µg.L ⁻¹)	
Analito	Genapol X-080 °	POLE (C ₁₂ E ₁₀) ^a	Polidocanol (C ₁₂ E ₉) ^a	C ₁₂ E ₆ ^b
PH	4	1	1	1
4-NP	2	1	1	1
2,4-DNP	3	1	1	1
PC	6	4	3	3
2-NP	3	1	1	2
2CP	5	3	3	3
4CP	- °	5	6	3
2,4-DMP	6	4	4	2
4,6-DNOC	3	1	1	1
4-CMC	5	3	3	1
2,4,6-TMP	5	3	3	4
2,4-DCP	5	3	3	3
4-C3,5-DMP	5	4	4	3
2,4,6-TCP	5	5	5	3
PCP	10	25	30	3

 Tabla II.10.
 Límites de detección obtenidos para la determinación de fenoles en muestras de agua utilizando la metodología de *punto de nube*.

^a Factor de preconcentración de 5; ^b Factor de preconcentración de 20; ^c No detectado.

Por último, los límites de detección determinados para cada uno de los fenoles estudiados, con el método analítico desarrollado empleando un medio micelar, aparecen recogidos en la Tabla II.10. Fueron calculados teniendo en cuenta la concentración de analito correspondiente a dos veces la altura de la línea base o ruido de fondo [60]. Como puede observarse, estos límites se encuentran comprendidos entre 1 y 6 μ g.L⁻¹ en las condiciones establecidas, a

excepción del PCP que presenta valores superiores. Los mejores resultados se obtienen para el $C_{12}E_6$, ya que los límites de detección no superan los 3 µg.L⁻¹. Estos límites de detección pueden mejorarse, ya que para el Genapol X-080 es posible conseguir un factor de preconcentración de 10 veces, para la mayoría de los analitos, excepto para el PC, 4-CP y el 2,4,6-TMP, con lo que los valores medios de los límites de detección se sitúan en 3 µg.L⁻¹. En el caso del POLE y el Polidocanol también es posible conseguir mejores límites de detección para los clorofenoles, ya que éstos pueden preconcentrarse hasta 10 veces. En la Figura II.18 se muestra un cromatograma de un extracto de una muestra previamente acondicionada con la mezcla de ocho fenoles, utilizando Polidocanol como extractante.



Figura II.18. Cromatograma del extracto obtenido al aplicar la extracción por *punto de nube* a una muestra, previamente acondicionada con la mezcla de ocho clorofenoles, utilizando Polidocanol como extractante.

Con objeto de validar el método propuesto, se utilizó una disolución estándar con los once fenoles considerados como contaminantes prioritarios por la USEPA. Esta mezcla de derivados fenólicos fue añadida a 10 mL de una disolución acuosa de cada surfactante y se procedió a su extracción y preconcentración mediante el método propuesto, empleando las condiciones de extracción optimizadas para cada uno de ellos, Tabla II.11. La Figura II.19 representa el cromatograma obtenido después de aplicar la extracción por *punto de nube* con el POLE a las disoluciones acondicionadas con esta mezcla estándar de fenoles.



Figura II.19. Cromatograma obtenido al aplicar la extracción por *punto de nube* a la mezcla estándar de fenoles utilizando POLE como extractante.

En dicha figura se observa que los diferentes fenoles contenidos en la disolución estándar pueden ser separados y cuantificados satisfactoriamente. Para la cuantificación de los picos se utilizaron las curvas de calibrado basadas en el área de los picos que se muestran en la Tabla A.2 del Anexo I de la presente Tesis.

	Recuperación (%) ^ª			
Analito	Genapol X-080 ^b	POLE ^c (C ₁₂ E ₁₀)	Polidocanol ^d (C ₁₂ E ₉)	C ₁₂ E ₆ ^d
PH	70.3	30.5	63.8	48.1
4-NP	87.5	80.4	73.5	68.3
2,4-DNP	89.4	75.0	74.6	72.9
2-NP	80.9	68.5	66.7	56.0
2CP	75.3	62.2	86.0	67.7
2,4-DMP	66.7	40.1	53.3	73.6
4,6-DNOC	108.4	99.0	101.6	92.4
4-CMC	100.5	91.5	87.7	99.8
2,4-DCP	109.8	91.7	92.0	110.4
2,4,6-TCP	118.5	90.5	99.0	73.0
PCP	102.1	108.7	108.2	87.9

 Tabla II.11.
 Porcentajes de recuperación de los derivados fenólicos de la disolución estándar obtenidos tras aplicar el proceso de extracción por punto de nube con los diferentes surfactantes estudiados.

^a Media de tres determinaciones; ^b Concentración añadida 100 µg.L⁻¹;

^c Concentración añadida 200 µg.L⁻¹; ^d Concentración añadida 50 µg.L⁻¹.

Los resultados de las recuperaciones obtenidas con cada uno de los surfactantes estudiados se muestran en la Tabla II.11. Las cantidades añadidas a la disolución de la mezcla estándar de fenoles es diferente para cada surfactante, ya que que el factor de preconcentración que se consigue para cada uno de ellos no es el mismo. Como puede observarse, los valores obtenidos dan porcentajes de recuperación superiores al 80 % para la mayoría de ellos y, por tanto, se puede afirmar que la extracción por *punto de nube* es una alternativa válida frente a los métodos convencionales de extracción líquido-líquido.

II. 2. 4. APLICACIONES EN MUESTRAS REALES

Los derivados fenólicos pueden encontrarse en el medio marino, puesto que normalmente son liberados a dicho medio por industrias que utilizan el cloro en sus procesos químicos. También pueden llegar a las costas como consecuencia del uso de determinados pesticidas, cuyos productos de degradación son fenoles. La alta toxicidad de algunos fenoles sustituidos, especialmente los clorofenoles, puede tener una gran repercusión sobre los organismos presentes en este medio. Generalmente, los clorofenoles son preferentemente adsorbidos en partículas orgánicas del agua y en sedimentos, debido a la baja solubilidad de algunos de estos compuestos en el agua. También son consumidos por los organismos marinos, con lo que se incorporan a la cadena trófica. Como consecuencia de todo ello, la concentración de este tipo de compuestos en agua de mar es reducida, por lo que es necesario, antes de proceder a su determinación, una etapa previa de preconcentración de los mismos.

Una vez que el método de extracción por *punto de nube* fue optimizado, éste se aplicó a la extracción y preconcentración de derivados fenólicos en muestras de agua de mar de las costas de las Islas Canarias y en aguas depuradas. Todas las muestras fueron previamente acondicionadas con la mezcla de quince fenoles, ya que en nuestras costas las aguas no presentan contaminación por este tipo de compuestos. Las concentraciones de los diferentes analitos utilizadas para acondicionar las muestras varían de 50 a 200 µg.L⁻¹, ya

92

que los factores de preconcentración varían de un surfactante a otro.

Cuando se aplica el método de extracción y preconcentración por *punto de nube* a muestras de agua de mar es necesario tener en cuenta la concentración de sal presente en las mismas. Por ello, solo se añade la cantidad de cloruro sódico necesario para alcanzar la concentración establecida para cada surfactante en la parte de optimización de condiciones.

Compuestos	Genapol X-080	POLE (C12E10)	Polidocanol (C ₁₂ E ₉)	C ₁₂ E ₆
PH	69.4	54.0	63.6	43.8
4-NP	85.0	66.6	78.6	70.5
2,4-DNP	71.2	55.0	73.8	62.0
PC	61.5	71.1	78.7	67.6
2-NP	73.2	58.2	72.8	56.5
2CP	74.5	56.4	102.2	76.3
4CP	- ^b	75.0	_ b	102.4
2,4-DMP	87.5	38.9	83.1	72.9
4,6-DNOC	93.9	74.3	91.2	85.7
4-CMC	98.7	85.6	90.3	100.0
2,4,6-TMP	74.4	- b	48.9	103.1
2,4-DCP	96.7	79.5	105.9	101.3
4-C3,5-DMP	106.1	90.6	109.6	100.1
2,4,6-TCP	106.9	84.7	105.3	82.9
PCP	110.1	128.9	112.2	102.1

Tabla II.12. Porcentajes de recuperación obtenidos después de la aplicación de la extracción y preconcentración de fenoles en muestras de agua de mar mediante la metodología de *punto de nube*^a.

^a Media de tres determinaciones; ^b No detectado.

La Tabla II.12 muestra los porcentajes de recuperación obtenidos al aplicar la extracción por *punto de nube* a muestras de agua de mar. En general, los resultados obtenidos para los compuestos más hidrofóbicos, con los cuatro surfactante estudiados, son mejores que los obtenidos para los compuestos más polares. Para estos últimos, los porcentajes de recuperación varían entre un 50 y un 80 %, dependiendo del analito y del surfactante. El 4-CP no pudo ser cuantificado con dos de los surfactantes utilizados.

En la Figura II.20 se muestra un cromatograma obtenido tras aplicar la metodología de *punto de nube* a una muestra de agua de mar para la determinación de los derivados fenólicos, utilizando Polidocanol como extractante.



Figura II.20. Cromatograma obtenido al aplicar la extracción por *punto de nube* a muestras de agua de mar utilizando Polidocanol como extractante.

En las plantas de depuración de aguas, los fenoles procedentes de desagües domésticos y vertidos industriales son convertidos en clorofenoles en los procesos de cloración. Por esta razón, la técnica de extracción optimizada fue aplicada también a muestras de agua procedentes de una depuradora.

En la Figura II.21 se presenta un cromatograma obtenido para una muestra de agua depurada después de aplicarle la metodología de *punto de nube*, utilizando POLE como extractante.



Figura II.21. Cromatograma obtenido al aplicar la extracción por *punto de nube* a muestras de agua depurada utilizando POLE como extractante.

En la Tabla II.13 se recogen los porcentajes de recuperación obtenidos al aplicar la extracción por punto de nube a este tipo de muestras.

Compuestos	Genapol X-080	POLE (C12E10)	Polidocanol (C ₁₂ E ₉)	C ₁₂ E ₆
PH	58.2	56.4	61.2	40.9
4-NP	70.4	60.0	81.4	79.0
2,4-DNP	66.0	58.1	78.0	65.7
PC	63.9	67.3	64.8	_ b
2-NP	65.1	52.7	77.5	67.6
2CP	70.4	67.0	96.0	79.0
4CP	_ b	81.9	_ b	114.8
2,4-DMP	74.3	67.8	50.7	- ^b
4,6-DNOC	82.0	71.0	91.1	72.0
4-CMC	91.9	86.2	96.6	101.2
2,4,6-TMP	67.4	64.3	90.3	_ b
2,4-DCP	100.7	83.8	105.0	104.9
4-C3,5-DMP	103.5	84.6	110.2	108.5
2,4,6-TCP	102.1	76.1	112.3	87.2
PCP	103.5	114.9	98.6	99.9

Tabla II.13. Porcentajes de recuperación obtenidos después de la aplicación de la extracción y preconcentración de fenoles en muestras de agua depurada mediante la metodología de *punto de nube*^a.

^a Media de tres determinaciones; ^b No detectado.

Los resultados obtenidos son similares a los que se obtienen con las muestras de agua de mar. Los compuestos más hidrofóbicos se extraen mucho mejor, con porcentajes comprendidos entre el 90 y el 100 % de recuperación para la mayoría de ellos. Sin embargo, la media en los valores de los porcentajes de recuperación de los compuestos más polares oscila entre el 60 y el 80 %. Cabe

2006

señalar que la extracción y preconcentración de los derivados fenólicos en estas muestras con el surfactante $C_{12}E_6$ presenta más dificultades con la matriz. Esto creemos que puede ser debido a que este tipo de aguas posee un alto contenido en materia orgánica y el factor de preconcentración con este surfactante es mayor, por lo que se extraen impurezas que interfieren en la cuantificación de los analitos. Sin embargo, con los otros surfactantes esta situación no se pone de manifiesto al ser la preconcentración menor.

II. 3. BIBLIOGRAFÍA

- C. Shöller, M. Wittwer, German Patents P. 605.973, P. 667.744, P. 694.178 to BASF, 30 Noviembre (1930).
- 2. J.J. Santana, M. Gunshefski, J.D. Winefordner, Talanta. 39 (1992) 195.
- D. Attwood, A.T. Florence, "Surfactant Systems: Their Chemistry, Pharmacy and Biology", Chapman and Hall, New York (1983).
- 4. W.L. Hinze, E. Pramauro, Critical Reviews in Analitycal Chemistry. 24 (2) (1993) 133.
- S.V.G. Menon, P.S. Goyal, B.A. Dasannacharya, P. Thiyagarajan, Phys. Rev.E.:Stat. Phys. Plasmas, Fluids, Relat. Interdiscip.Top., 53 (1996) 6569.
- 6. U. Pfuller, Mizellen, Vesikel, Mikroemullsionen: Tensidassoziate und ihre Anwendung in Analytik und Biochemie, Veb Verlag, Berlin (1986).
- 7. B. Lindman, H. Wennerstrom, J. Phys. Chem., 95 (1991) 6053.
- M. Corti, V. DeGiorgio, J.B. Hayter, M. Zulanf, Chem. Phys. Lett., 109 (1984) 579.
- 9. V. DeGiorgio, R. Piazza, M. Corti, C. Minero, J. Chem. Phys., 82 (1984) 1025.
- 10. P. Nilsson, H. Wennerstrom, B. Lindman, J. Chem. Phys., 87 (1984) 1377.
- V. De Giorgio, "Nonionic Micelles, in Physics of Amphiphiles: Micelles, Vesicles and Microemulsions", V. De Giorgio and M. Corti, Eds., North-Holland, Amsterdam. (1985).
- 12. S. Puvvada, D. Blankschtein, J. Chem. Phys., 92 (1990) 3710.
- G. Mathis, p. Leempoel, J.C. Ravey, C. Selve, J.J. Delpuech, J. Anal. Chem. Soc., 106 (1984) 6162.
- 14. S. Puvvada, D. Blankschtein, J. Chem. Phys., 96 (1999) 5579.
- 15. L.A.M. Rupert, J. Colloid Interface Sci., 153 (1989) 92.
- 16. T. Kato, T. Seimiya, J. Phys. Chem., 90 (1986) 3159.
- 17. K.V. Schubert, R. Strey, M. Kahlweit, J. Colloid Interface Sci., 141 (1991) 21.
- 18. T. Suzuki, K. Esumi, K. Meguro, J. Colloid Interface Sci., 93 (1983) 205.
- 19. L. Reatto, M. Tau, Chem. Phys. Lett., 108 (1984) 292.

- M. Ishikawa, K.I. Matsumura, K. Esumi, K. Meguro, W. Binana-Limbele, R. Zana, J. Colloid Interface Sci., 151 (1992) 70.
- 21. G.L. Mcintire, Anal. Chem. 21 (1990) 257.
- 22. M. Brusdeilins, V. Zarybnicky, J. Chromatog., 287 (1984) 313.
- S.M. Zourab, V.M. Zabet, H. Aboeldahal, J. Dispersion Sci. Tech., 12 (1991) 25.
- 24. L. Marszall, Colloids Surf., 25 (1987) 279.
- 25. M.M. Chobarm, M.V. Ropot, Izv. Akad. Nauk Mold. SSR, Ser. Biol. Khim. Nauk., 1, 53 (Chem. Abstr., 107, 61031k), (1987).
- 26. F. Tokiwa, T. Matsumoto, Bull. Chem. Soc. Jpn., 48 (1975) 1645.
- 27. R. Aveyard, T.A. Lawless, J. Chem. Soc., Faraday Trans. I., 82 (1986) 2951.
- 28. P. Firman, D. Haase, J. Jen, M. Kalweit, R. Strey, Langmuir., 1 (1985) 718.
- K. Shinoda, S. Friberg, Emulsions and Solubilization, Wiley Interscience, New York (1986) p. 22.
- 30. A. Goto, M. Nihei, F. Endo, J. Phys. Chem., 84 (1980) 2268.
- 31. M. Donbrow, E. Azay, J. Colloid Interface Sci., 57 (1976) 20.
- N. Nishikoto, H.A. Kisada, R. Matuura, Mem. Fac. Sci., Kyushu Univ., Ser. C., 10 (1977) 91.
- 33. C. Manokar, V.K. Kelkar, J. Colloid Interface Sci., 137 (1990) 604.
- 34. N. Nishikido, J. Colloid Interface Sci., 136 (1990) 401.
- S. Kaneshida, O. Shibata, M. Nakamua, Bull. Chem. Soc. Jpn., 52 (1979)
 42.
- 36. A. Bockelen, R. Niessner, Fresenius J. Anal. Chem., 346 (1993) 435.
- R.C. Martínez, E.R. Gonzalo, M.G.G. Jiménez, C.G. Pinto, J.L.P. Pavón, J.H. Méndez, J. Chromatogr., 754 (1996) 85.
- 38. T. Saitoh, W.L. Hinze, Anal. Chem. 63 (1991) 2520.
- 39. S. Akita, H. Takeuchi, Separ. Sci. Technol., 30 (1995) 833.
- 40. R.P. Frankewich, W.L. Hinze, Anal. Chem., 66 (1994) 944.
- W.L Hinze, Cloud Point Extraction and Preconcentration Procedures for Organic and Related Pollutants of State Concern, Report N
 ^o 269; Water Resources Research Institute of the University of North Carolina, Raleigh,

99

June (1992), 36.

- 42. S.R. Sirimanne, J.R. Barr, D.G. Patterson, J. Microcol. Sep. 11 (1999) 109.
- 43. H. Watanabe, H. Tanaka, Talanta. 25 (1978) 585.
- 44. C. Bordier, J. Biol. Chem., 256 (1981) 1604.
- 45. C. Fini, M. Coli, A. Floridi, Biochim. Biophys. Acta (1991) 20.
- A. Sánchez-Ferrer, R. Bru, F. García-Carmona, Anal. Biochem., 184 (1990) 279.
- 47. M. Yamazaki, M. Ohshika, T. Ito, Biochim. Biophys. Acta, 1063 (1991) 175.
- 48. D. Hardeman, C. Versantvoor, J.M. van den Brink, H. van den Bosch, Biochim. Biophys. Acta (1990) 149.
- 49. I. Casero, D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, Anal. Chem., 71 (1999) 4519.
- C. García-Pinto, J.L. Pérez-Pavón, B. Moreno-Cordero, Anal. Chem., 66 (1994) 874.
- A. Eiguren Fernández, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodríguez, Quim. Anal., 16 (1997) 283.
- A. Eiguren Fernández, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodríguez, Anal. Chim. Acta, 358 (1998) 145.
- A. Eiguren Fernández, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodríguez, Analyst, 124 (1999) 487.
- 54. C. García-Pinto, J.L. Pérez-Pavón, B. Moreno-Cordero, Anal. Chem., 67 (1995) 2696.
- 55. B. Moreno-Cordero, J.L. Pérez-Pavón, C. García-Pinto, Encyclopedia of Environmental Analysis and Remediation, R.A. Meyer (Ed.) Wiley (1998).
- L. Calvo-Seronero, M.E. Fernández-Laespada, J.L. Pérez-Pavón, B. Moreno-Cordero, J. Chromatogr. A, 897 (2000) 171.
- 57. R.L. Revia, G.A. Makharadze, Talanta, 48 (1999) 409.
- 58. A. Eiguren Fernández, "Utilización de sistemas moleculares organizados en la extracción y preconcentración de compuestos organoclorados de interés medioambiental y su determinación por cromatografía líquida de alta eficacia". Tesis Doctoral, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Las

Palmas de Gran Canaria (2000).

- R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, B. Moreno-Cordero, J. L. Pérez-Pavón, C. García-Pinto and E. Fernández-Laespada, J. Chromatogr. A, 902 (2000) 251.
- S. Lindsay, High Performance Liquid Chromatography, Wiley, New York, (1992) 71
CAPÍTULO III

EXTRACCIÓN EN MUESTRAS SÓLIDAS

III.1. INTRODUCCIÓN

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

El Soxhlet es particularmente útil porque muchos contaminantes suelen estar muy fuertemente adsorbidos en las matrices sólidas (sedimentos, tierras, tejidos de orgamismos y plantas, etc.,) pero requiere tiempos de extracción demasiado largos y el uso de los mencionados disolventes orgánicos en grandes cantidades. Este hecho aumenta la toxicidad y encarece el proceso. Como consecuencia de las condiciones utilizadas para la extracción, puede producirse, además, la degradación de los analitos y pérdidas por volatilización de los mismos [1,2].

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

En la última década se ha producido una demanda creciente de nuevas técnicas de extracción susceptibles de ser automatizadas, con tiempos de extracción cortos y un consumo reducido de disolventes orgánicos, a fin de prevenir problemas de toxicidad en los laboratorios y reducir los costes de preparación de muestras [3,4]. De esta forma han surgido nuevas técnicas como la extracción con fluidos supercríticos, SFE [5-7], la extracción líquida presurisada, PLE [8] y la extracción asistida por microondas, MAE [9-11].

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

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

El uso de la energía de las microondas como fuente de calor en el tratamiento de muestras sólidas fue inicialmente aplicada al análisis de trazas metálicas en muestra biológicas [12]. Desde entonces, la digestión por microondas se ha utilizado para la extracción de compuestos orgánicos e inorgánicos de diferentes tipos de muestras, con especial atención a aplicaciones medioambientales.

Actualmente, este tipo de extracción es una técnica consolidada, y ya han sido publicados algunos métodos estandards, fundamentalmente para la extracción de compuestos orgánicos en matrices sólidas [13-16]. Ganzler et al. [17] fueron los primeros en utilizar un horno microondas convencional para la extracción de compuestos orgánicos de muestras sólidas, utilizando los mismos disolventes que se usan normalmente en la extracción con Soxhlet. A comienzo de los años 90, varios grupos de investigadores comienzan a utilizar los hornos microondas caseros para la extracción de diferentes contaminantes en diversos tipos de muestras. A estos trabajos les seguió una extensa publicación de López Ávila et al. [18] donde presentan los procedimientos de extracción de diferentes compuestos orgánicos tales como hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), pesticidas organoclorados (OCPs) y fenoles en materiales de referencia, tanto en suelos como en sedimentos. Utilizaron como extractante una mezcla de acetonahexano (1:1) y determinaron los porcentajes de recuperación a diferentes

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

temperaturas y tiempos de extracción.

Desde entonces, numerosas aplicaciones de la extracción asistida por microondas han sido publicadas para diferentes compuestos orgánicos en diversas matrices, con especial énfasis en aplicaciones medioambientales [10].

La extracción asistida por microondas (MAE) consiste en calentar el extractante (generalmente un disolvente orgánico) en contacto con la muestra mediante la energía de las microondas. La partición de los analitos de interés de la muestra al extractante depende de la temperatura y de la naturaleza del extractante.

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

El calentamiento usando energía de microondas se basa en el efecto directo de las radiaciones de microondas en las moléculas, bien por conducción iónica o por rotación de dipolos. En muchas aplicaciones estos dos mecanismos tienen lugar simultáneamente. La conducción iónica se debe a la migración de los iones cuando un campo eléctrico es aplicado. La resistencia del disolvente a este movimiento de los iones produce una fricción y, como consecuencia, un calentamiento. La rotación de los dipolos se debe al alineamiento de las moléculas de la muestra y del disolvente que poseen momentos dipolares permanentes o inducidos debido al campo eléctrico aplicado. Estos movimientos moleculares son los que producen el calentamiento.

La capacidad de un disolvente para absorber la energía de microondas y liberarla en forma de calor a otras moléculas depende del factor de disipación (*tan*

 δ), que es la relación entre la pérdida dieléctrica de la muestra (factor de pérdida, ε ') y su constante dieléctrica (ε). El factor de pérdida dieléctrica es una medida de la capacidad que posee la muestra para disipar la energía absorbida en forma de calor y la constante dieléctrica es una medida de la polarizabilidad de una molécula en un campo eléctrico.

Para una frecuencia dada, cuanto mayor sea la constante dieléctrica, mayor cantidad de energía térmica se libera y más rápidamente se calienta la muestra. Así, moléculas polares y disoluciones iónicas absorben la energía de microondas rápidamente, ya que poseen momentos dipolares permanentes, que son afectados por la radiación de microondas. Sin embargo, los disolventes no polares no se calientan cuando se exponen a la radiación de microondas y hay que mezclarlos con disolventes más polares.

Por tanto, el efecto de la energía de microondas es totalmente dependiente de la naturaleza de la muestra y del disolvente. La mayoría de la veces el extractante elegido tiene una constante dieléctrica alta para que absorba fuertemente la energía de las microondas. Sin embargo, en algunos casos, solamente la matriz puede ser calentada, para que los analitos pasen a un extractante frío. Esto es particularmente útil en el caso de los compuestos termolábiles, para prevenir su degradación. El hecho de que diferentes sustancias químicas absorban la radiación de microondas en diferente extensión, implica que el calentamiento efectuado en un determinado medio varía dependiendo del tipo de sustancia. Por tanto, en medios de características estructurales no homogéneas, o que contengan especies químicas de diferentes propiedades dieléctricas, dispersas en un medio homogéneo, es posible que se produzca un calentamiento selectivo de algunas áreas o compuestos de la muestra [19].

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

108

vasos abiertos (a presión atmosférica).

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

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

La optimización de la extracción asistida por microondas implica el estudio de los parámetros que tienen influencia en la extracción. Muchos investigadores han utilizado diseños factoriales, de composición central u ortogonal, para determinar las condiciones óptimas [20-22]. Entre los parámetros más estudiados se encuentran la composición y la naturaleza de los extractantes, así como el

109

volumen del mismo; el tiempo y la temperatura de extracción; las características de la matriz y el grado de humedad de la misma.

III.1.1. Naturaleza de los extractantes

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

Para la selección del disolvente, tenemos que tomar en consideración algunas de las propiedades del mismo, como son su capacidad para absorber la radiación de microondas, sus interacciones con la matriz, así como su capacidad para solubilizar el analito. Otro importante aspecto es la compatibilidad del disolvente utilizado para la extracción con el método analítico usado como paso final en la determinación.

Es común utilizar como disolventes en la extracción por microondas los mismos que se utilizan en los métodos convencionales de extracción. Sin embargo, no siempre son los más adecuados. El extractante elegido debe ser capaz de absorber la energía de las radiaciones de microondas. La cantidad de energía absorbida es proporcional a la constante dieléctrica del disolvente, y en la práctica, muchas veces, la absorber la energía, el extractante debe ser capaz de convertirla en calor, ya que la eficiencia de la extracción depende del factor de pérdida dieléctrica. Así por ejemplo, se ha encontrado que disolventes puros que absorben la energía de microondas fuertemente pueden ser utilizados satisfactoriamente, como es el caso del diclorometano, que se encontró que el era el disolvente adecuado para la extracción de oligoelementos de bajo peso molecular [23], o el tetrahidrofurano, que era el mejor extractante para los pesticidas organoclorados (OCPs) [24].

Es posible combinar disolventes para mejorar la eficiencia del proceso. Se ha encontrado que pequeñas variaciones en la composición del disolvente producen una mejora en la eficacia de la extracción. Por ejemplo, la mezcla de diclorometano-metanol (90:10) para la extracción de atrazina y sus metabolitos polares en sedimentos produce una sensible mejora en la selectividad de la extracción [25]. Otro ejemplo de la eficiencia de una mezcla de disolventes en la extracción es el uso de tolueno-agua (90:10) para extraer numerosos compuestos (PAHs, PCBs y pesticidas organoclorados) en sedimentos marinos [26].

Aunque predomina el uso de disolventes orgánicos, también se han utilizado fases acuosas en algunos casos. Una mezcla metanol-agua (80:20) se usó para extraer especies del arsénico en tejidos de peces [27]; o una reguladora de acetato de amonio (pH=10) se utilizó para la extracción de herbicidas en sedimentos [28].

Para evitar la degradación de compuestos termolábiles se utilizan mezclas de disolventes con alta y baja pérdida dieléctrica. López-Ávila et al. han extraído 95 compuestos orgánicos semivolátiles utilizando una mezcla hexanoacetona como extractante. [29]. Esta mezcla de disolventes también se ha utilizado para la extracción de otros compuestos contaminantes en muestras medioambientales tales como hidrocarburos aromáticos policiclícos, (PAHs), hidrocarburos alifáticos, fenoles, pesticidas organoclorados, etc. [21,30-32]. Barnabas et al. [33] estudiaron el efecto de la relación hexano-acetona en la recuperación de PAHs, y encontraron que la recuperación aumenta con el incremento en la cantidad de acetona. En lugar de utilizar una mezcla de dos disolventes orgánicos, también se ha incorporado agua a disolventes que no absorben la radiación de microondas. Muchas veces una pequeña cantidad de agua (aproximadamente el 10%) es añadida a los disolventes no polares como hexano, o tolueno [26], con objeto de mejorar la velocidad de calentamiento y la polaridad.

Cuando tenemos una muestra con alta pérdida dieléctrica, es decir, con

111

un alto contenido en agua, una buena eficacia en la extracción puede ser conseguida utilizando un disolvente puro transparente a la radiación de microondas. Esto es posible ya que el agua en el interior de la muestra puede ser localmente calentada. Un ejemplo de esta situación es la extracción de aceites esenciales de plantas, donde la radiación de microondas interacciona directamente con las moléculas de agua libres en el interior de la matriz, con lo cual, sufren una drástica expansión que rompe los tejidos permitiendo a los aceites esenciales pasar al disolvente. [34].

III.1.2. Volumen de extractante

En algunos casos el volumen del disolvente puede ser un parámetro importante para mejorar la eficacia de la extracción. Dicho volumen debe ser suficiente como para que toda la muestra se encuentre inmersa en el mismo. La cantidad de disolvente necesaria para la extracción está comprendida, generalmente, entre 10 y 30 mL. Algunos investigadores han llegado a la conclusión de que la proporción entre la cantidad de muestra y de disolvente no debería exceder de un 30-34 % (m/v) [32].

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 disolvente, disminuye la eficacia de la extracción. El fenómeno ha sido estudiado por varios grupos de investigación [35-37]. En algunos casos, pequeños volúmenes de extractantes son suficientes para conseguir una extracción óptima; así, por ejemplo, con sólo 10 mL de extractante es posible extraer satisfactoriamente fenol y metilfenol de 5 gramos de una muestra de sedimento [38].

III.1.3. Temperatura

La temperatura, probablemente el parámetro más estudiado, es un factor fundamental en el proceso de extracción por microondas. Valores elevados de la

misma generalmente aumentan la eficiencia de la extracción, bien como resultado de un aumento de la difusión del disolvente en el interior de la matriz, bien debido a la desorción de los analitos de los sitios activos de la misma.

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

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 [39-41]. Cuando se extraen pesticidas, como las triazinas, de suelos, la temperatura óptima depende de la polaridad del analito así como del tipo de suelo; pero temperaturas entre 80 y 100°C dan porcentajes de recuperación aceptables [42]. En otros casos, la influencia de la temperatura en la extracción es escasa, como se ha demostrado en la extracción de diversos contaminantes orgánicos en materiales de referencia de suelos y sedimentos [18].

Sin embargo, hay que tener en cuenta que, a temperaturas elevadas, también pueden ser extraídas sustancias no deseadas, por lo que se pierde selectividad en la extracción. Además, hay que considerar la posible degradación de los analitos a temperaturas elevadas. Esto ha quedado demostrado en la extracción de herbicidas sulfonilurea [25] utilizando una temperatura de 100°C. Los porcentajes de recuperación obtenidos fueron bajos, debido probablemente a la descomposición de los analitos. Para obtener resultados satisfactorios hubo que disminuir la temperatura hasta 70°C. Un efecto similar se ha observado en la extracción de aminas aromáticas añadidas a muestras de cuero. Se estudió un intervalo de temperaturas entre 40 y 80°C y los mejores resultados se obtuvieron con la temperatura más baja [43].

La temperatura óptima de la extracción depende también del tipo de matriz. Esto se comprobó en la extracción de pesticidas en diferentes tipos de cultivos: mientras que 100°C era una temperatura óptima para lechugas, para tomates era necesario elevar la temperatura hasta 120°C [44].

III.1.4. Potencia

En los sistemas cerrados la presión es también una variable importante, pero ésta es función de la temperatura. Por lo general, es este el parámetro que se investiga. Sin embargo, cuando se trabaja con hornos microondas en los que no se puede controlar la temperatura, la presión en los vasos es el parámetro a optimizar [45,46].

La potencia elegida, en los sistemas de vasos cerrados, depende del número de vasos utilizados durante el proceso. Hay que tener en cuenta que algunos sistemas permiten realizar la extracción de 12 muestras simultáneamente. Para evitar la posible degradación de algunos compuestos y una presión elevada en el interior de los vasos, esta potencia debe ser elegida cuidadosamente. La influencia de la potencia en la extracción está relacionada con el tiempo de extracción por microondas. Se ha comprobado que en la extracción de hidrocarburos en sedimentos [32], con una potencia de 300 W, el tiempo necesario para obtener porcentajes de recuperación óptimos era 9 minutos; sin embargo, 6 minutos eran suficientes para obtener buenos resultados si la potencia se elevaba a 500-700 W.

III.1.5. Tiempo de extracción

Como en otras técnicas de extracción, el tiempo es otro parámetro que influye en la misma y que necesita ser considerado. En MAE, los tiempos de extracción son mucho más cortos que los necesarios en las técnicas convencionales, donde los tiempos de extracción pueden ser en muchos casos superiores a 24 h. A menudo 10 minutos son suficientes, como se ha demostrado para la extracción de contaminantes orgánicos [47], pero incluso se ha

demostrado que 3 minutos suficientes para la extracción de pesticidas en suelos y sedimentos [46,48].

En muchos casos, se ha comprobado que utilizar tiempos de extracción más largos no conlleva una mejora de la eficacia de la extracción. [25,36,49]. En estos casos no se ha observado que exista degradación o alteración de los compuestos por largos tiempos de irradiación.

En el caso de compuestos termolábiles, el uso de tiempos de extracción muy largos puede provocar la degradación de estos compuestos, como ha sido demostrado para la extracción de pesticidas [44].

III.1.6. Naturaleza de la matriz

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

López-Ávila et al. estudiaron la influencia de la matriz en la extracción de contaminantes orgánicos en cuatro muestras certificadas de sedimentos marinos y dos muestra de suelos. Encontraron que la extracción de PAHs varía entre 60-100% [18] aplicando el mismo procedimiento, dependiendo de la naturaleza de la matriz. En particular, 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.

Por esta misma razón, bajo las mismas condiciones, resulta mas fácil la extracción de los contaminantes en muestras enriquecidas que la de los contaminantes nativos de las mismas [33]. En la mayoría de los casos, se obtienen mayores recuperaciones para muestras enriquecidas que para los contaminantes nativos, demostrando el efecto de la fuerte interacción de la matriz

con estos contaminantes nativos en función del tiempo de contacto. Este hecho también explica la disminución de la recuperación en la extracción en muestras envejecidas. Este es un fenómeno bien conocido, que se ha puesto de manifiesto también en otras técnicas de extracción como SFE. Esto puede ser explicado teniendo en cuenta el tiempo que el analito ha estado en contacto con la muestra [50-52], y si éste es incorporado solo por adsorción superficial, donde la formación de enlaces de hidrógeno y las interacciones por fuerzas de Van der Waals son los procesos predominantes, o está fuertemente ligado a la materia orgánica de la matriz de la muestra debido a mecanismos de transporte por difusión [53]. En un estudio realizado por López Ávila et al. [29] sobre muestras enriquecidas, los porcentajes de recuperación de algunos pesticidas organoclorados disminuían desde un 80-120 % hasta un 50-60 % después de 24 horas, mientras que los porcentajes de recuperación de pesticidas organofosforados prácticamente no variaban después de un periodo de envejecimiento de tres semanas.

Otro factor de gran importancia en la eficacia de la extracción es el contenido en agua de la matriz. Esto se debe a que las moléculas de agua tienen un momento dipolar alto y absorben la energía de las microondas fuertemente; esto conduce a un calentamiento eficiente de la muestra. Como consecuencia de este hecho, para obtener resultados reproducibles es necesario controlar el contenido de agua de la matriz. En el caso de muestras de suelos y sedimentos, hay una discusión sobre si la muestra debe estar húmeda o seca para obtener un mejor rendimiento en la extracción. El efecto de este parámetro, desde luego, va a depender del disolvente utilizado para realizar la extracción. Excepto para disolventes polares, el agua añadida, o contenida en la muestra, siempre mejora la absorción de radiaciones de microondas y, por tanto, facilita el proceso de calentamiento de la muestra. También, puede tener un efecto dilatador en la matriz, e influir en la interacción matriz-analito, haciendo al analito más disponible para ser extraído por el disolvente.

Esto ha quedado demostrado en un trabajo de extracción de pesticidas de

sedimentos, donde la humedad de la muestra era un parámetro significativo a la hora de tener resultados satisfactorios. La mejor recuperación se obtuvo usando iso-octano como extractante [48] con un 15 % de humedad. Este porcentaje coincidía con el nivel de saturación del sedimento. Similares investigaciones sobre el efecto del agua han sido realizadas para otros tipos de muestras. En la extracción de PAHs, fenoles y derivados bencénicos de muestras de suelos usando MAE, la presencia de agua (20 %) aumentaba la extracción de algunos compuestos pero reducía los porcentajes de recuperación de otros [18]. Con solutos básicos y con algunos compuestos fenólicos, las extracciones han sido mejores con matrices húmedas que con matrices secas [31]. Este hecho puede ser atribuido a que el agua añadida queda atrapada entre la estructura del material orgánico de la matriz, y cuando se calienta, destruye dicha estructura rompiendo los enlaces de los analitos y éstos pueden ser extraídos con mayor facilidad. Sin embargo, no siempre la humedad de la matriz mejora la extracción de los solutos. Extracciones realizadas con diferentes combinaciones de disolventes han demostrado que para solutos neutros las mayores recuperaciones se producen cuando las matrices están secas [54].

El pH de la matriz es otro parámetro que puede tener influencia en la extracción. M.A. Crespín et al. [55], en un estudio realizado con diferentes tipos de suelos, observaron que para tierras con pH ácido, un mayor contenido en materia orgánica favorecía la extracción de fenoles, siendo el efecto más marcado para clorofenoles que para alquilfenoles. Esto puede deberse a la presencia de sustancias orgánicas tales como ácidos húmicos. Cuando el contenido en materia orgánica del suelo es pequeño los fenoles pueden adsorberse sobre estos ácidos, que se encuentran sobre la superficie del mineral. Sin embargo, al aumentar el contenido de materia orgánica, los ácidos húmicos adoptan una configuración interfacial que reduce la adsorción de los fenoles, con lo que facilitan su extracción.

En suelos alcalinos el efecto era el contrario, es decir, se produce una

menor extracción de estos compuestos al aumentar el contenido en materia orgánica. En los suelos alcalinos la materia orgánica está negativamente cargada por lo que los grupos hidroxilos no están disociados, y, por tanto, la carga positiva del anillo prevalece sobre el carácter dador de electrones del grupo metilo y las interacciones electrostáticas tienen lugar entre la materia orgánica y los alquilfenoles. La presencia de cloros o grupos nitro dota al analito de un carácter aceptor de electrones; por otro lado, la materia orgánica puede actuar como dador de electrones debido a su estructura aromática. Por ello, es posible que se establezcan fuertes enlaces entre ambos. El efecto es más pronunciado con altos contenidos en materia orgánica [56].

III.1.7. Aplicaciones de la extracción asistida por microondas

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

En la Tabla III.1 se recogen algunas de las numerosas aplicaciones de la MAE. En todas ellas se utilizan disolventes orgánicos como extractantes. Puede observarse que la extracción asistida por microondas representa una alternativa viable a las técnicas de extracción convencionales, ya que la eficacia conseguida por esta técnica es comparable a las obtenidas con otras. Además, con respecto a las técnicas convencionales, la MAE presenta una gran reducción del tiempo de análisis y de consumo de disolvente, así como la posibilidad de realizar extracciones simultáneas con reproducibilidades aceptables.

Por otro lado, los resultados evidencian que la MAE puede competir favorablemente con otras técnicas modernas como la extracción con fluídos supercríticos (SFE) o la extracción líquida presurisada (PLE). Particularmente, la optimización de las condiciones experimentales para utilizar MAE es mas sencilla,

118

ya que en ella el número de parámetros experimentales que hay que optimizar es menor.

Compuestos	Matriz	Disolvente	Tiempo de extracción (min)	Recuperación (%)
	Suelos y sedimentos (material certificado)	Hexano-acetona (1:1)	10	65-115
PAHs	Cenizas	Hexano-acetona (1:9)	20	90
	Suelos contaminados	Acetona	20	75-105
PCBs	Suelos y sedimentos (material certificado)	Suelos y sedimentos Hexano-acetona (material (1:1) certificado)		70-110
	Suelos (material certificado)	Hexano-acetona (26:74)	40	94-110
	Sedimentos (material certificado)	Hexano-acetona (1:1)	15	73-93
PCDDs/PCDFs	Sedimentos (material certificado)	Hexano-acetona (1:1)	20	80-105
	Suelos y sedimentos (material certificado)	Hexano-acetona (1:1)	10	18-89
Fenoles	Suelos contaminados	Hexano-acetona (1:1)	20	-
	Muestras de suelos enriquecidas	Hexano-acetona (1:1)	16.5	50-125

Tabla III.1.	Aplicaciones de la	extracción asistida	por microondas	[43,57].
--------------	--------------------	---------------------	----------------	----------

En la Tabla III.2 se comparan las características de las principales técnicas de extracción.

	Extracción Soxhlet	Sonicación	SFE	PLE	MAE
Tiempo de extracción	De 24 a 48 horas	De 30 a 60 minutos	De 30 a 60 minutos	15 minutos	De 20 a 30 minutos
Extractante	Disolventes orgánicos	Disolventes orgánicos	Disolventes en su estado supercrítico	Disolventes orgánicos a elevadas presiones y temperaturas	Disolventes orgánicos
Costo	Bajo	Bajo	Alto	Alto	Moderado
Desventajas	Se utilizan grandes cantidades de disolventes y es necesario evaporar el extracto	Se utilizan grandes cantidades de disolventes y se requiere filtación	Cantidad limitada de la muestra y dependencia del tipo de matriz y analito	Dependencia de la matriz	Se requiere tratamiento previo de la muestra

Tabla III.2. Características de las principales técnicas de extracción.

III.1.8. Extracción asistida por microondas utilizando surfactantes

Una nueva posibilidad de aplicación de MAE es el uso de medios micelares como extractantes, es decir, la extracción asistida por microondas con utilización de medios micelares, MAME. Los medios micelares pueden ser aplicados para la solubilización, extracción y preconcentración de diferentes compuestos presentes en diferentes muestras medioambientales, tales como suelos y sedimentos, con los beneficios que aporta la utilización de los mismos, como son bajo coste, fácil manipulación y reducción de los efectos tóxicos respecto al uso de disolventes orgánicos.

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

En la Figura III.1 se representa esquemáticamente el proceso de extracción por microondas utilizando surfactantes.

La utilización de medios micelares en la extracción asistida por microondas es relativamente reciente. En la Tabla III.3 se recogen algunas de estas aplicaciones.



Figura III.1. Representación del proceso de extracción por microondas con utilización de surfactantes.



Compuestos	Matriz	Surfactante	Recuperación (%)	Ref.
	Sedimentos marinos	POLE	85.7-100.7	22
- PAHs	Material de referencia certificado (Sedimentos marinos)	Brij 35	Superior a 80	58
	Material de referencia certificado (Sedimentos marinos)	POLE	77.4-86.5	59
	Material de referencia certificado (Sedimentos marinos)	POLE	58.6-111.5	60
PCBs	Sedimentos marinos	Genapol X-080 POLE	81.0-95.0	61
PCDFs	Sedimentos marinos	Genapol X-080 POLE	> 70	62
PCBs			> 70	
PCDFs		PULE	> 80	03
PCDDs	Sodimontoo moris	Genapol X-080	55.1-107.5	64
		POLE	61.6-108.5	04

Tabla III.3.	Aplicaciones	de medios micelares	en la extracción	n asistida por	microondas	(MAME).
--------------	--------------	---------------------	------------------	----------------	------------	---------

III.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el desarrollo de nuevos métodos analíticos es importante establecer aquellos valores de las variables experimentales que puedan influir en la señal a medir. En este sentido, una parte importante de los estudios a desarrollar se han dirigido a la optimización de estos factores. Cuando se utiliza la metodología de extracción asistida por microondas (MAE) los factores principales que deben tenerse en cuenta a la hora de optimizar dicho método son aquellos que pueden tener alguna influencia, no solo sobre los analitos en estudio, sino también sobre la matriz en la que se encuentran y sobre el extractante utilizado en el proceso. La optimización de la metodología MAME se ha realizado para una mezcla de ocho clorofenoles con los dos tipos de matrices utilizadas en este trabajo, sedimentos marinos y suelos. En ambas matrices se han estudiado los siguientes factores:

- Volumen de surfactante
- Concentración de surfactante
- pH de la disolución extractante
- Tiempo de irradiación
- Potencia de irradiación

En las estrategias tradicionales, para alcanzar las condiciones óptimas de trabajo solo se cambia una variable cada vez, mientras permanecen constantes el resto de los factores. Esta aproximación requiere un gran número de experiencias, y no permite el análisis de los cambios en algunas de las respuestas que pueden tener lugar cuando dos o más factores se modifican simultáneamente. El diseño experimental constituye una alternativa a estas estrategias, permitiendo que se puedan variar simultáneamente los factores a la vez que se estudian sus efectos. Por ello, dado que el tiempo y la potencia de irradiación del microondas son dos parámetros que se influyen mutuamente, para su optimización se ha utilizado un diseño factorial.

III.2.1. SEDIMENTOS MARINOS

III.2.1.1.OPTIMIZACIÓNDELPROCESODEEXTRACCIÓNPORMICROONDAS CON MEDIOS MICELARES EN SEDIMENTOS MARINOS

La optimización de los factores antes señalados se llevó a cabo utilizando un sedimento marino procedente del Puerto de Taliarte (Gran Canaria), de textura arenosa y con un tamaño de grano inferior a 0,150 mm.

Inicialmente se siguió un procedimiento secuencial para optimizar el volumen y concentración de surfactante, ya que en experiencias previas se comprobó que la interacción entre ellas no era estadísticamente significativa. Se eligió una potencia de 200 W y un tiempo de 3 minutos para optimizar el volumen de surfactante y la concentración del mismo. Una vez fijados, estos valores se utilizaron para determinar las condiciones óptimas de irradiación, tiempo y potencia. La influencia del pH de la disolución en la eficiencia de la extracción se estudió posteriormente.

III.2.1.1.1. Efecto del volumen de surfactante

En algunos casos este parámetro puede ser importante a la hora de conseguir una extracción eficiente. El volumen de surfactante utilizado en la extracción debe permitir que toda la muestra esté en contacto con el mismo [33]. En este estudio se analizó la influencia de este parámetro en la extracción variando la relación entre el volumen de surfactante y la masa de muestra. Se utilizaron cuatro relaciones diferentes pero en todas se mantuvo constante la cantidad de muestra, 2 gramos; los volúmenes de surfactante fueron 2, 4, 8 y 12 mL, manteniendo la concentración del mismo constante.

La Tabla III.4 muestra los porcentajes de recuperación obtenidos para la mezcla de clorofenoles utilizando diferentes volúmenes de Polidocanol. Estos resultados muestran que, una vez que el volumen de surfactante es suficiente para mojar toda la muestra, un aumento del mismo no modifica, prácticamente, los

porcentajes de extraccción. Así los valores obtenidos para 4, 8 y 12 mL son similares para todos los compuestos. Cuando se utilizan 2 mL de surfactante el volumen de extractante no es suficiente y la muestra no se moja totalmente. Para 2 gramos de muestra, 4 mL de surfactante son suficientes, por lo que se eligió este volumen para continuar la optimización. Este mismo comportamiento se observó para los otros surfactantes estudiados.

Compuesto	Volumen de surfactante						
Compuesto	4 mL	8 mL	12 mL				
PH	95.2	93.9	99.6				
2CP	91.3	88.9	90.9				
4CP	100.5	94.7	98.5				
4-CMC	100.1	92.5	91.8				
2.4-DCP	95.1	92.0	90.2				
4-C-3.5-DMF	98.8	91.8	80.8				
2.4.6-TCP	103.2	94.8	96.6				
PCP	94.5	92.8	88.2				

 Tabla III.4.
 Porcentajes de recuperación de clorofenoles utilizando diferentes volúmenes de Polidocanol como extractante ^a.

^a Media de tres determinaciones.

III.2.1.1.2. Efecto de la concentración de surfactante

La eficiencia del surfactante para extraer los analitos presentes en las muestras de sedimento dependerá, entre otros factores, del número de micelas presentes en la disolución del mismo, es decir, de la concentración de surfactante. A fin de establecer la influencia de este parámetro en el proceso de extracción, se utilizaron cuatro concentraciones diferentes de cada uno de los surfactantes estudiados, superiores a la concentración micelar crítica.

La Figura III.2 muestra los porcentajes de recuperación obtenidos para concentraciones de surfactante comprendidas entre 1 y 7.5 % (v/v). En las gráficas se han representado los valores obtenidos para tres analitos de diferente polaridad. En general, el comportamiento de los tres compuestos es el mismo para un surfactante dado y este mismo comportamiento se repite en los otros clorofenoles estudiados. Sin embargo, puede observarse la diferencia entre el Genapol X-080 y los otros surfactantes polioxietilénicos: mientras que para éstos los porcentajes de recuperación aumentan o se mantienen prácticamente constantes a medida que aumenta la concentración de surfactante, en el caso del Genapol X-080 los mejores resultados se obtienen para bajas concentraciones del mismo. Así, a partir de una concentración del 3% (v/v) los porcentajes de recuperación disminuyen. Una posible explicación a este fenómeno sería el hecho de que el Genapol posee mayor viscosidad que los otros surfactantes a la misma concentración, con lo que la interacción, entre los analitos y las micelas del surfactante, no sería tan eficiente. Por tanto, se eligió una concentración del 2% (v/v) de este surfactante para continuar optimizando el resto de parámetros implicados en la extracción.

Para los otros surfactantes estudiados una concentración del 5% (v/v) proporciona los mejores resultados. A partir de esta concentración los porcentajes de recuperación disminuyen ligeramente o permanecen constantes. Esta concentración fue la elegida para la optimización del proceso de extracción con los surfactantes polioxietilen 10 lauril éter (POLE) y polioxietilen 9 lauril éter (polidocanol).

En el caso del surfactante polioxietilen 6 lauril éter, $C_{12}E_6$, a pesar de que los porcentajes de extracción mejoran con la concentración de surfactante, se utilizó un 2% (v/v) para la optimización de las condiciones de irradiación del microondas con objeto de determinar si era posible obtener resultados satisfactorios modificando únicamente dichas condiciones.



Figura III.2. Porcentajes de recuperación obtenidos en la extracción de clorofenoles utilizando diferentes concentraciones de surfactante.

III.2.1.1.3. Tiempo y potencia de irradiación

Como se comentó previamente, el tiempo y la potencia de irradiación son parámetros que están interrelacionados, por lo que su influencia en la eficiencia de la extracción se estudió utilizando un diseño factorial para obtener así los niveles óptimos de dichos parámetros. Este tipo de estrategia implica realizar un número relativamente bajo de experimentos para establecer las condiciones óptimas. El método tradicional de variar "un factor cada vez" no suele ser la mejor opción; puede implicar más experimentos de los necesarios y, a pesar de ello, proporcionar sólo información parcial, ya que solo estima el efecto de una única variable en unas condiciones seleccionadas y fijas del resto. Para realizar la optimización de variables existen diferentes métodos [65-67]. En nuestro trabajo se utilizó un diseño central compuesto (CCD) que está basado en un diseño factorial de dos niveles que incluye réplicas del punto central y puntos axiales. Este es el resultado de superponer un diseño factorial de dos niveles, (2^N), a un diseño estrella, (2N+1), dando lugar a 2^N+2N+1 experimentos, que son suficientes para definir los términos lineal, cuadrático e interacciones, así como el error en los términos.

Los datos obtenidos para cada compuesto se pueden ajustar a una función polinómica de primer o segundo grado del tipo:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_1 x_2 + \beta_4 x_1^2 + \beta_5 x_2^2$$

donde x_1 y x_2 representan las variables a optimizar, en nuestro caso potencia y tiempo de irradiación respectivamente, y β_i los parámetros del modelo que hay que determinar. Dichos parámetros se estiman mediante regresión múltiple. Una vez obtenida la función que relaciona la variable dependiente, porcentaje de recuperación, con las independientes, tiempo y potencia, podemos obtener las superficies de respuesta, es decir, la representación tridimensional de la función que nos permite visualizar las condiciones óptimas.

En nuestro caso, el diseño central compuesto implicó 11 experimentos, puesto que son dos las variables o factores a optimizar. Se eligieron como valores inferior y superior del tiempo 2 y 14 minutos; para la potencia, 100 y 500 watios, respectivamente. El resto de variables implicadas en el proceso se mantuvieron constantes: 2 gramos de muestra, 4 mL de surfactante, con la concentración previamente establecida, y la concentración de analito añadida a la muestra.

Para realizar la optimización de las variables con el surfactante

polioxietilen 10 lauril éter (POLE) se utilizaron disoluciones con una concentración del 5 % (v/v) del mismo. En la Tabla III.5 se muestran los valores de los diferentes niveles de los factores, tiempo y potencia, en el diseño experimental y los porcentajes de recuperación obtenidos en cada experimento utilizando dicho surfactante como extractante.

 Tabla III.5.
 Diseño de la matriz y porcentajes de recuperación obtenidos en el diseño experimental utilizando POLE como extractante.

Dise	no		Recuperación (%)						
Potencia (W)	Tiempo (mín)	РН	2-CP	4-CP	4-CMC	2,4-DCP	4-C-3,5-DMP	2,4,6-TCP	PCP
100	2	80.2	79.9	78.3	76.2	78.2	63.6	76.6	64.2
100	8	91.1	90.7	91.7	91.1	91.8	81.1	95.7	74.8
100	14	99.7	99.2	102.8	103.8	103.6	95.4	112.3	86.0
300	2	89.1	90.0	93.0	92.4	92.2	84.5	96.6	81.4
300	8	93.3	93.7	96.8	97.0	97.0	91.0	102.9	86.5
300	8	99.0	98.4	101.5	102.9	101.2	97.8	106.5	93.9
300	8	97.2	97.9	101.9	100.8	99.1	97.0	109.1	92.1
300	14	97.5	97.3	100.5	101.5	101.8	97.6	109.2	91.6
500	2	95.7	98.0	105.4	106.6	104.5	102.1	114.1	99.4
500	8	95.5	96.7	101.8	102.9	102.2	100.9	110.1	98.2
500	14	93.2	93.4	95.8	97.4	98.1	96.5	103.8	98.2

En la Tabla III.6 se muestran los valores de los parámetros (coeficientes) obtenidos al aplicar la regresión múltiple a los datos procedentes del diseño central compuesto. Todos los parámetros poseen el mismo signo y orden de magnitud para los ocho clorofenoles estudiados. En la misma tabla se presentan los valores obtenidos para R², coeficiente de determinación; este parámetro nos

proporciona una medida descriptiva del ajuste global del modelo.

Compuesto	β ₀	β1	β2	β ₁₂	β11	β22	R²
PH	67.63	0.0793	3.012	-4.58.10 ⁻³	-5.24.10 ⁻⁵	-0.0582	0.936
2CP	66.92	0.0843	2.991	-4.98.10 ⁻³	-4.86.10 ⁻⁵	-0.0554	0.951
4CP	61.22	0.1148	3.727	-7.10.10 ⁻³	-5.47.10 ⁻⁵	-0.0608	0.967
4-CMC	58.02	0.1216	3.989	-7.67.10 ⁻³	-5.08.10 ⁻⁵	-0.0578	0.971
2.4-DCP	62.88	0.1010	3.435	-6.63.10 ⁻³	-3.67.10 ⁻⁵	-0.0408	0.983
4-C-3.5-DMF	40.88	0.1552	4.691	-7.79.10 ⁻³	-7.22.10 ⁻⁵	-0.0789	0.975
2.4.6-TCP	54.66	0.1455	4.899	-9.58.10 ⁻³	-5.45.10 ⁻⁵	-0.0605	0.981
PCP	46.47	0.1246	3.100	-4.79.10 ⁻³	- 4.54 .10 ⁻⁵	-0.0504	0.963

 Tabla III.6.
 Valores de los parámetros obtenidos con el CCD para la extracción de clorofenoles con POLE.

La Figura III.3 muestra la superficie de respuesta obtenida para el 2clorofenol utilizando POLE como extractante. En esta representación se observa que los porcentajes de recuperación son altos cuando se aumenta el valor de uno de los dos parámetros, independientemente del valor que tenga el otro. En la región de tiempos y potencias bajos el porcentaje de recuperación es menor, debido, probablemente, a que no tiene lugar una buena interacción entre el surfactante y los analitos, por lo que no se produce la difusión de los mismos desde la matriz al seno de la disolución. Las superficies de respuesta para los otros clorofenoles estudiados presentan la misma forma, con valores óptimos de recuperación para potencias de irradiación de 500 W, mientras que el tiempo de irradiación puede oscilar entre 2 y 14 minutos. A la vista de estos resultados, se eligieron como condiciones óptimas para la extracción una potencia de 500 W y el tiempo mínimo, 2 minutos, con objeto de no alargar el tiempo de análisis. Para los otros surfactantes estudiados, C₁₂E₉, C₁₂E₆ y Genapol X-080, se llevó a cabo el mismo procedimiento para optimizar, en cada caso, las mejores condiciones para la extracción mediante el uso del diseño factorial. Los resultados obtenidos se encuentran recogidos en las Tablas numeradas de III.7 al III.12. En la Figura III.4 se muestran a modo de ejemplo las superficies de respuesta obtenidas para el 4-CMC con cada uno de estos surfactantes. Como se observa en todos los casos, la eficacia en la extracción aumenta con la potencia y es ligeramente mejor para tiempos de extracción cortos.

En la superficie de respuesta del 4-CMC, utilizando Genapol X-080 como extractante, puede observarse que, aunque la zona del máximo es la misma que en la de los surfactantes mencionados anteriormente, a medida que aumenta el tiempo disminuye la eficacia en la extracción si la potencia es alta. Esta disminución es más significativa con este surfactante que con los otros.



Figura III.3. Superficie de respuesta del 2-CP utilizando POLE como extractante.

Dise	eño		Recuperación (%)						
Potencia (W)	Tiempo (min)	PH	2-CP	4-CP	4-CMC	2,4-DCP	4-C-3,5-DMP	2,4,6-TCP	PCP
100	2	85.8	79.4	83.7	79.0	77.9	72.9	84.9	70.2
100	8	90.5	85.8	91.8	94.6	84.0	84.0	93.3	79.1
100	14	95.1	91.7	99.1	110.7	94.0	92.9	102.6	87.0
300	2	94.6	91.1	99.1	96.1	94.9	94.9	101.6	90.5
300	8	95.1	90.8	98.5	100.7	92.7	95.6	101.0	92.4
300	8	94.9	90.8	99.5	100.3	95.6	98.7	102.5	97.2
300	8	95.5	91.8	101.6	99.9	94.6	99.0	104.0	91.9
300	14	95.6	90.5	97.9	105.4	96.4	96.4	100.4	94.3
500	2	103.4	102.1	114.0	113.7	106.0	114.2	120.1	110.0
500	8	99.7	95.7	105.3	106.9	107.3	107.3	108.7	105.8
500	14	95.8	88.4	96.3	100.7	93.8	97.1	102.4	101.1

 Tabla III.7.
 Diseño de la matriz y porcentajes de recuperación obtenidos en el diseño experimental utilizando Polidocanol como extractante.

Tabla III.8.	Valores de los parámetros obtenidos con el CCD para la extracción de clorofenoles con
Polidocanol	

Compuesto	β_0	β1	β ₂	β ₁₂	β ₁₁	β22	R ²
PH	78.96	0.0521	1.163	-3.52.10 ⁻³	-0.18.10 ⁻⁵	-0.0582	0.999
2CP	69.77	0.0736	1.721	-5.42.10 ⁻³	-0.98.10 ⁻⁵	-0.0554	0.998
4CP	70.54	0.1005	2.324	-6.90.10 ⁻³	-1.86.10 ⁻⁵	-0.0608	0.990
4-CMC	63.96	0.1000	3.412	-9.31.10 ⁻³	0.89.10 ⁻⁵	-0.0578	1.000
2.4-DCP	63.81	0.1018	2.272	-5.90.10 ⁻³	-1.99.10 ⁻⁵	-0.0408	0.936
4-C-3.5-DMF	53.93	0.1451	3.208	-7.73.10 ⁻³	-4 .32.10 ⁻⁵	-0.0789	0.994
2.4.6-TCP	72.15	0.0998	2.144	-7.38.10 ⁻³	0.20.10 ⁻⁵	-0.0605	0.984
PCP	54.59	0.1224	2.321	-5.35.10 ⁻³	- 2.07.10 ⁻⁵	-0.0504	0.986

Dise	ะกิด		Recuperación (%)						
Potencía (W)	Tiempo (min)	РН	2-CP	4-CP	4-CMC	2,4-DCP	4-C-3,5-DMP	2,4,6-TCP	РСР
100	2	93.6	84.5	87.8	79.2	86.2	71.4	96.0	70.2
100	8	92.8	86.6	89.2	81.0	88.7	73.9	98.9	71.2
100	14	94.3	93.4	91.1	83.5	92.4	75.8	99.7	70.9
300	2	94.9	91.7	96.8	91.9	97.7	89.1	107.6	91.6
300	8	92.8	89.6	92.7	87.7	95.5	87.4	105.4	87.9
300	8	84.8	76.6	88.3	84.0	87.9	83.8	107.1	92.0
300	8	92.8	83.3	95.3	88.5	96.4	92.3	112.8	93.6
300	14	90.8	87.5	88.5	83.5	93.2	85.6	103.3	84.2
500	2	98.6	103.7	106.4	105.3	110.3	106,3	116.9	112.5
500	8	92.8	92.6	96.2	94.4	102.3	100.9	111.9	104.6
500	14	89.8	86.0	86.8	84.1	94.7	94.7	105.0	98.2

Tabla III.9.Diseño de la matriz y porcentajes de recuperación obtenidos en el diseño experimental
utilizando $C_{12}E_6$ como extractante.

Tabla III.10.	Valores de los parámetros obtenidos con el CCD para la extracción de clorofenoles
con C ₁₂ E ₆ .	

Compuesto	$oldsymbol{eta}_0$	β1	β2	β ₁₂	β11	β22	R ²
PH	96.05	-0.0124	-0.615	-1.98.10 ⁻³	4.77.10 ⁻⁵	0.0544	0.625
2CP	86.33	-0.0047	-0.591	-5.54.10 ⁻³	10.64.10 ⁻⁵	0.1183	0.801
4CP	82.69	0.0487	0.556	-4.77.10 ⁻³	1.20.10 ⁻⁵	0.0120	0.925
4-CMC	72.25	0.0665	0.611	-5.31.10 ⁻³	1.57.10 ⁻⁵	0.0175	0.979
2.4-DCP	80.96	0.0502	0.423	-4.54.10 ⁻³	3.24.10 ⁻⁵	0.0346	0.904
4-C-3.5-DMF	60.43	0.0994	0.886	-3.33.10 ⁻³	-0.91.10 ⁻⁵	-0.0115	0.970
2.4.6-TCP	85.27	0.0885	1.490	-3.25.10 ⁻³	-4.97.10 ⁻⁵	-0.0539	0.919
PCP	55.76	0.1336	1.030	-3.13.10 ⁻³	-3.80.10 ⁻⁵	-0.0423	0.987

Diseño			Recuperación (%)						
Potencia (W)	Tiempo (mín)	РН	2-CP	4-CP	4-CMC	2,4-DCP	4-C-3,5-DMP	2,4,6-TCP	PCP
100	2	87.3	86.1	83.9	81.2	82.4	77.7	92.3	66.0
100	8	87.6	85.6	89.2	84.4	83.7	85.2	91.4	69.7
100	14	87.6	83.5	84.5	75.8	84.7	64.9	89.0	60.6
300	2	90.2	91.1	96.8	90.5	90.7	91.2	102.7	84.8
300	8	86.8	85.9	92.7	84.8	86.4	91.9	97.0	82.0
300	8	86.5	87.3	83.9	82.9	88.8	83.4	100.0	87.3
300	8	89.0	86.8	87.7	86.5	88.5	79.1	100.8	89.7
300	14	83.4	80.8	88.5	79.1	82.1	92.7	91.2	79.3
500	2	93.0	94.8	96.8	97.4	99.8	96.7	111.7	95.5
500	8	86.0	86.3	96.2	85.2	89.0	98.7	102.5	94.3
500	14	78.5	74.2	73.4	73.7	79.8	72.4	92.1	79.3

 Tabla III.11.
 Diseño de la matriz y porcentajes de recuperación obtenidos en el diseño experimental utilizando Genapol X-080 como extractante.

 Tabla III.12.
 Valores de los parámetros obtenidos con el CCD para la extracción de clorofenoles con Genapol X-080.

Compuesto	β_0	β ₁	₿₂	β ₁₂	β ₁₁	β22	R ²
PH	84.23	0.0266	0.522	-3.08.10 ⁻³	- 1.01.10 ⁻⁵	-0.0113	0.972
2CP	81.09	0.0454	0.649	-3.75.10 ⁻³	- 2.56.10 ⁻⁵	-0.0284	0.992
4CP	75.19	0.0778	1.561	-5.00.10 ⁻³	- 5.08.10 ^{-₅}	-0.0578	0.692
4-CMC	75.70	0.0644	0.654	-3.81.10 ⁻³	-3.57.10 ⁻⁵	-0.0397	0.936
2.4-DCP	75.47	0.0608	0.903	-4.65.10 ⁻³	-1.47.10 ⁻⁵	-0.0150	0.981
4-C-3.5-DMF	65.33	0.1124	1.505	-2.40.10 ⁻³	-9.99.10 ⁻⁵	-0.1110	0.553
2.4.6-TCP	84.16	0.0770	0.709	-3.40.10 ⁻³	-3.63.10 ⁻⁵	-0.0404	0.980
PCP	46.87	0.1624	2.380	-2.25.10 ⁻³	-13.95.10 ⁻⁵	-0.1536	0.966



Figura III.4. Superficies de respuesta del 4-CMC, utilizando como extractante Polidocanol (a), C₁₂E₆ (b) y Genapol X-080 (c).

III.2.1.1.4. Efecto del pH

Con objeto de comprobar si el proceso de extracción también puede verse influenciado por el pH de la disolución extractante, se modificó el pH de la misma añadiendo ácido acético o hidróxido de sodio. La variación en el pH de la disolución puede modificar la forma iónica de los analitos a extraer y, con ello, afectar las interacciones analito-surfactante y analito-sedimento. Para investigar el efecto de este parámetro en la eficiencia de la extracción, las muestras de sedimento se sometieron al proceso de extracción utilizando estas disoluciones en las condiciones de potencia y tiempo previamente establecidas.

Los resultados obtenidos muestran que un pH básico mejora ligeramente la extracción de algunos analitos, como el fenol y el 2-clorofenol, pero en los restantes clorofenoles los porcentajes de recuperación apenas varían. Los fenoles son ácidos débiles y en disoluciones básicas se transforman en fenolatos. Estos son menos volátiles que las moléculas sin ionizar, por lo que un pH básico evitaría la pérdida de los compuestos más volátiles de la mezcla. Esto podría justificar los porcentajes de recuperación ligeramente más altos de los clorofenoles más sencillos cuando se aumenta el pH de la disolución [68,69]. Sin embargo, decidimos no modificar el pH de la disolución extractante ya que no se mejora significativamente la extracción de los otros compuestos presentes en la mezcla.

III.2.1.2. PARÁMETROS ANALÍTICOS Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Para determinar la precisión del método de extracción propuesto se realizó un estudio estadístico del mismo con seis muestras de sedimento marino procedentes del Puerto de Taliarte. Las muestras se acondicionaron con la mezcla de quince fenoles, de manera que la concentración final de cada uno de ellos fuese la misma que la utilizada en el proceso de optimización. Esta nueva mezcla incluye fenoles con grupos nitro, grupos metilo y los clorofenoles utilizados en la optimización de variables. La presencia de átomos o grupos de átomos diferentes en la molécula de fenol a los utilizados en el proceso de optimización confiere a dichas moléculas características diferentes, por lo que las interacciones que se establecen entre el analito y las partículas de sedimento o entre el analito y las micelas del surfactante pueden ser también diferentes. La extracción de estos nuevos analitos nos permite determinar si las condiciones de irradiación optimizadas pueden ser aplicadas con éxito a otro tipo de compuestos de la misma familia.

Estas muestras fueron sometidas al proceso completo de extracción asistida por microondas, con los cuatro surfactantes estudiados, y a la posterior separación y determinación por HPLC con detección UV. La Figura III.5 muestra el cromatograma obtenido para la mezcla de los quince fenoles utilizando $C_{12}E_6$ como extractante.



Figura III.5. Cromatograma del extracto obtenido al aplicar MAME con una disolución de C₁₂E₆ a muestras de sedimento del Puerto de Taliarte.

En dicho cromatograma se observa que la separacion entre picos es suficiente para cuantificar satisfactoriamente los direrentes analitos. Además, puede comprobarse que la señal del $C_{12}E_6$, al igual que los otros surfactantes utilizados, se encuentra al principio del cromatograma, por lo que no interfiere en los picos de interés.

	Recuperación (%) ^a				
Analito	Genapol X-080	POLE (C ₁₂ E ₁₀)	Polidocanol (C ₁₂ E ₉)	C ₁₂ E ₆	
PH	78.1	93,1	100.2	103.6	
4-NP	88.0	93,8	106.8	115.8	
2,4-DNP	101.2	86,7	110.3	118.1	
PC	88.6	94,0	90.7	106.5	
2-NP	97.6	90,8	101.8	116.2	
2CP	93.4	89,4	95.8	114.8	
4CP	65.9	96,5	105.9	111.0	
2,4-DMP	70.7	60,0	69.4	88.2	
4,6-DNOC	98.7	86,2	107.8	119.5	
4-CMC	85.7	80,6	101.3	113.0	
2,4,6-TMP	23.7	12,1	14.9	25.0	
2,4-DCP	87.7	87,3	103.3	108.6	
4-C3,5-DMP	78.6	77,2	95.2	107.7	
2,4,6-TCP	101.1	80,6	107.3	102.7	
PCP	99.4	84,0	97.9	112.5	

Tabla III.13.	Recuperac	iones obtenidas	para la mezcla	de quince fenoles tras
aplicar MAME	a muestra	as de sediment	o marino proced	dentes del Puerto de
Taliarte.				

^a Valor promedio de seis determinaciones.

Los resultados obtenidos para todos los surfactantes se muestran en la Tabla III.13. En general, los porcentajes de extracción son bastante satisfactorios, si bien los del Genapol X-080 son ligeramente inferiores a los obtenidos con los otros surfactantes. Cabe destacar las recuperaciones bajas del 2,4-DMP y del

2,4,6-TMP. Estos compuestos, con 2 y 3 grupos metilo respectivamente, quedan más fuertemente retenidos en el sedimento, por lo que las condiciones previamente optimizadas no son las más adecuadas para realizar su extracción. Por otra parte, los fenoles con grupos nitro presentan porcentajes de recuperación iguales o superiores a los de los clorofenoles, por lo que la potencia y el tiempo de irradiación aplicados también son adecuados para la extracción de este tipo de compuestos.

Respecto a los compuestos con grupos metilo en la molécula, además de grupos nitro o átomos de cloro, hay que señalar la poca influencia de los mismos en la adsorción; estos compuestos se comportan como nitrofenoles o clorofenoles.

Analito	Genapol X-080	POLE (C ₁₂ E ₁₀)	Polidocanol (C ₁₂ E ₉)	C ₁₂ E ₆
PH	5.1	7,2	3.8	6.4
4-NP	1.1	4,0	1.3	4.8
2,4-DNP	2.9	8,0	2.0	5.2
PC	9.6	11,4	9.9	6.2
2-NP	5.0	6,5	4.6	5.0
2CP	7.9	9,3	9.5	9.5
4CP	4.8	15,9	2.7	3.8
2,4-DMP	5.7	4,5	2.6	5.8
4,6-DNOC	4.7	5,0	3.2	5.0
4-CMC	3.9	7,3	4.1	4.5
2,4,6-TMP	9.5	15.9	9.1	8.7
2,4-DCP	5.0	7,3	5.7	3.3
4-C3,5-DMP	4.3	5,0	5.6	2.5
2,4,6-TCP	5.1	4,4	6.2	3.8
PCP	5.0	5,4	5.8	4.4

 Tabla III.14.
 Valores de la desviación estándar (%) obtenidos tras aplicar

 MAME a muestras de sedimento marino procedentes del Puerto de Taliarte.
Los valores obtenidos para la desviación estándar relativa RSD (%), Tabla III.14, muestran valores inferiores al 10%, excepto para el PC, el 4-CP y el 2,4,6-TMP con el POLE como extractante.

Por último, los límites de detección para la determinación de los derivados fenólicos en sedimentos aparecen recogidos en la Tabla III.15. Estos límites se encuentran comprendidos entre 1 y 16 μ g.L⁻¹, valores que se encuentran dentro del intervalo de concentraciones de estos analitos en muestras contaminadas [70].

Analito	Genapol X-080	POLE (C ₁₂ E ₁₀)	Polidocanol (C ₁₂ E ₉)	C ₁₂ E ₆
PH	13	5	5	12
4-NP	3	2	2	2
2,4-DNP	3	3	3	4
PC	11	16	10	13
2-NP	4	3	3	4
2CP	10	8	9	5
4CP	17	12	12	14
2,4-DMP	11	2	8	3
4,6-DNOC	3	1	2	1
4-CMC	16	3	5	3
2,4,6-TMP	15	3	5	3
2,4-DCP	15	2	5	2
4-C3,5-DMP	19	3	6	3
2,4,6-TCP	14	2	4	2
PCP	20	17	10	15

 Tabla III.15.
 Límites de detección obtenidos para la determinación de fenoles en muestras de sedimento marino utilizando MAME.

Con objeto de validar el método propuesto, se utilizó una disolución estándar conteniendo los once fenoles considerados como contaminantes prioritarios por la USEPA. Los sedimentos procedentes del Puerto de Taliarte se

acondicionaron con esta mezcla y se sometieron al proceso de extracción con microondas empleando las condiciones de extracción optimizadas en los apartados anteriores. La Figura III.6 representa el cromatograma obtenido después de aplicar la extracción con Polidocanol al sedimento enriquecido en dichas condiciones. El análisis de los datos obtenidos muestra que para los diferentes fenoles contenidos en dicha muestra se obtienen tiempos de retención satisfactorios utilizando una fase móvil de agua:metanol (70:30) en régimen isocrático durante 16 minutos y un gradiente de 24 minutos para alcanzar un 100 % de metanol. Para la cuantificación de los picos se utilizaron las curvas de calibrado basadas en el área de los picos que se muestran en la Tabla A.2 del Anexo I de la presente Tesis.



Figura III. 6. Cromatograma del extracto de muestras de sedimento marino procedentes del Puerto de Taliarte, utilizando Polidocanol como extractante.

Los resultados obtenidos con cada uno de los surfactantes estudiados se muestran en la Tabla III.16. Como puede observarse, se pone de manifiesto que la extracción asistida por microondas utilizando medios micelares puede considerarse una alternativa válida frente a los métodos convencionales de extracción.

Analito	Concentración de analito encontrada (µg.L ⁻¹) ^b									
	Genapol X-080	POLE (C ₁₂ E ₁₀)	Polidocanol (C ₁₂ E ₉)	C 12E6						
PH	1.9	1.9	2.2	1.9						
4-NP	2.0	1.9	2.1	1.9						
2,4-DNP	2.2	2.1	1.7	2.2						
2-NP	2.2	2.0	1.8	2.0						
2CP	2.1	1.9	1.8	1.8						
2,4-DMP	1.0	1.1	1.2	0.8						
4,6-DNOC	2.0	2.1	1.8	1.7						
4-CMC	1.8	1.6	1.8	1.9						
2,4-DCP	1.8	1.8	1.9	1.9						
2,4,6-TCP	2.0	1.7	2.1	2.0						
PCP	1.8	2.2	1.9	2.0						

Tabla III.16. Resultados obtenidos al aplicar MAME a una muestra de sedimento marino procedente del Puerto de Taliarte, conteniendo la disolución estándar de derivados fenólicos ^a.

^a Media de tres determinaciones; ^b Concentración de analito añadida: 2 µg.L⁻¹

III.2.1.3. APLICACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN POR MICROONDAS CON MEDIOS MICELARES A MUESTRAS DE SEDIMENTOS MARINOS

Tras optimizar los factores de los que depende el método de extracción por microondas, diferentes muestras de sedimentos marinos fueron sometidas al mismo. Estos sedimentos proceden de diferentes zonas de las costas de las islas de Gran Canaria y Fuerteventura. Se utilizaron dos sedimentos arenosos procedentes de la playa de Las Canteras (Gran Canaria) y de la playa de Jandía (Fuerteventura). Éstos presentan características diferentes en cuanto a tamaño de grano, porcentaje de materia orgánica, carbonatos y óxidos de hierro. Las muestras fueron previamente acondicionadas, tal y como se explica en la Parte Experimental, con una mezcla de 15 fenoles. En la Figura III.7 se muestra un cromatograma del extracto obtenido de una muestra de la Playa de Jandía utilizando POLE como extractante.



Figura III. 7. Cromatograma del extracto de muestras de sedimento marino procedentes de la Playa de Jandía, utilizando POLE como extractante.

Los porcentajes de recuperación obtenidos, media de la determinación de tres muestras independientes, se muestran en la Tablas III.17 y III.18. A efectos de comparación, en cada una de las tablas se recogen los porcentajes de

recuperación de la extracción de los quince derivados fenólicos en cada uno de los sedimentos, Las Canteras y Fuerteventura, con los cuatro surfactantes estudiados.

	Recuperación (%) ^a								
Analito	Genapol X-080	POLE (C ₁₂ E ₁₀)	Polidocanol (C ₁₂ E ₉)	C ₁₂ E ₆					
PH	86.0	88,2	111.1	102.9					
4-NP	88.9	97,4	113.9	114.3					
2,4-DNP	99.5	98,8	117.1	115.6					
PC	85.6	114,0	101.3	105.8					
2-NP	97.3	93,5	103.6	106.9					
2CP	94.2	83,4	88.9	113.5					
4CP	49.4	78,9	114.4	80.6					
2,4-DMP	79.4	78,8	104.2	101.9					
4,6-DNOC	97.0	85,7	114.9	110.2					
4-CMC	92.2	84,4	107.4	107.3					
2,4,6-TMP	75.7	77,1	79.4	94.2					
2,4-DCP	83.3	86,5	117.4	105.5					
4-C3,5-DMP	82.0	78,9	100.7	104.1					
2,4,6-TCP	97.0	86,9	108.3	111.3					
PCP	71.1	103,2	94.9	96.7					

 Tabla III.17.
 Porcentajes de recuperación obtenidos tras aplicar MAME a muestras de sedimento marino procedentes de la Playa de Las Canteras (Gran Canaria).

^a Media de tres determinaciones.

En general, los resultados que se obtienen ponen de manifiesto que la utilización de la extracción asistida por microondas, utilizando medios micelares como extractantes, conduce a resultados muy satisfactorios en todos los casos. Cabe destacar el aumento de la extracción de los compuestos con grupos metilo, 2,4-DMP y 2,4,6-TMP respecto a los obtenidos con los sedimentos procedentes del Puerto de Taliarte. En aquellos sedimentos, con un tamaño de grano mayor, estos compuestos están menos retenidos, por lo que es más fácil su extracción. Aunque la composición de estos dos nuevos tipos de sedimentos es diferente a la

del Puerto de Taliarte, están constituidos básicamente por carbonatos, creemos que el tamaño de partícula es el factor determinante en la absorción de los analitos y su posterior extracción.

Por otra parte, y como ocurría con el sedimento del Puerto de Taliarte, el Genapol X-080 es el surfactante que da lugar a recuperaciones ligeramente inferiores, fundamentalmente en el sedimento de Playa de Jandia, si bien se obtienen valores superiores al 70% para el sedimento de Playa de las Canteras.

	Recuperación (%) ^a								
Analito	Genapol X-080	POLE (C ₁₂ E ₁₀)	Polidocanol (C ₁₂ E ₉)	C ₁₂ E ₆					
PH	73.0	80,7	101.9	94.2					
4-NP	82.4	100,4	107.5	108.7					
2,4-DNP	92.9	103,5	110.5	101.1					
PC	71.3	106,2	98.1	80.8					
2-NP	82.3	87,4	97.4	85.7					
2CP	67.1	74,1	89.7	74.8					
4CP	59.2	73,3	107.2	111.1					
2,4-DMP	67.3	72,3	96.4	92.3					
4,6-DNOC	83.7	87,9	107.8	103.1					
4-CMC	71.1	78,4	99.6	99.9					
2,4,6-TMP	58.3	76,7	82.1	86.9					
2,4-DCP	64.8	86,9	99.3	96.3					
4-C3,5-DMP	61.3	75,5	90.7	94.3					
2,4,6-TCP	86.4	86,0	100.6	101.5					
PCP	58.3	99,2	97.9	89.2					

Tabla III.1	8.	Porcentajes	de	recu	iperación	obte	nidos	tras	aplica	ar N	/AME a
muestras	de	sedimento	ma	rino	procede	ntes	de	la F	Playa	de	Jandía
(Fuerteven	tura).									

^a Media de tres determinaciones.

III.2.1.3.1. Aplicación del proceso MAME a muestras de sedimentos marinos envejecidas

Los métodos de extracción tradicionales no consiguen extraer la totalidad de los analitos presentes en una muestra cuando éstos llevan mucho tiempo en las mismas. En estos casos, las fuerzas de interacción que existen entre los analitos y el sedimento son mucho más intensas [52,71].

Con objeto de estudiar la influencia del tiempo de envejecimiento de las muestras en la absorción de los analitos, se analizaron muestras con 3 y 6 meses de envejecimiento antes de realizar la extracción. El sedimento procedente del Puerto de Taliarte fue el utilizado para realizar este estudio.



Figura III.8. Influencia del tiempo de envejecimiento en los porcentajes de recuperación de los derivados fenólicos en muestras del Puerto de Taliarte usando Polidocanol como extractante.

En la Figura III.8 se han representado los resultados obtenidos en la extracción de muestras de sedimento utilizando Polidocanol como extractante. En dicha figura se observa que los porcentajes de recuperación disminuyen al aumentar el tiempo de envejecimiento de la muestra, excepto en el caso del 2,4,6-TMP y del PCP. A pesar de la disminución de la eficiencia en la extracción, la mitad de los analitos estudiados pueden ser extraídos con unos porcentajes superiores al 70 % después de tres meses. Este mismo estudio fue realizado con el POLE como extractante y los resultados obtenidos fueron similares.

Estos resultados pueden ser considerados satisfactorios si tenemos en cuenta que, durante los periodos de envejecimiento estudiados, los compuestos pueden degradarse e incluso, los más ligeros, llegar a volatilizarse. Después de 6 meses, 10 compuestos pueden extraerse del sedimento con una recuperación superior al 50 %. Aunque este porcentaje es relativamente bajo, esta metodología podría utilizarse para determinar cualitativamente la presencia de estos contaminantes en sedimentos marinos.

La Figura III.9 muestra la variación en los porcentajes de extracción de los derivados fenólicos incluidos en la lista de la USEPA como contaminantes prioritarios después de 6 meses de acondicionamiento utilizando los cuatro surfactantes en estudio. Se han omitido los otros compuestos para mayor claridad en la figura.

Se puede observar que los derivados fenólicos con grupos nitro son los que presentan los mejores resultados. Los porcentajes de recuperación más bajos corresponden a un compuesto con dos grupos metilo, el 2,4-DMP. Excepto este compuesto y el 2-CP, el resto de los analitos pueden ser extraídos con porcentajes de recuperación superiores al 50 %. El PCP se extrae mejor con los surfactantes más polares, el POLE y el Polidocanol. En general, en este período de tiempo estudiado, los surfactantes que proporcionan mejores porcentajes de extracción son el Genapol X-080 y el polioxietilen 6 lauril éter, $C_{12}E_6$.



Figura III.9. Porcentajes de recuperación de los derivados fenólicos considerados contaminantes prioritarios por la USEPA tras aplicar MAME a muestras del Puerto de Taliarte con seis meses de envejecimiento, utilizando los cuatro surfactantes.

III.2.2. SUELOS

III.2.2.1. OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN POR MICROONDAS CON MEDIOS MICELARES EN MUESTRAS DE SUELOS

Los suelos constituyen un tipo de matriz más compleja que la estudiada en el apartado anterior, por lo que, además de optimizar los parámetros relacionados con el microondas y el extractante, se han estudiado algunas características de los suelos como el pH, la textura o granolumetría y el contenido en materia orgánica. También se estudió la influencia de la concentración de analito en la muestra sobre los porcentajes de recuperación. Para los estudios de este apartado se eligieron tres tipos de suelos cuyas características se recogen en la Tabla III.19.

Inicialmente se realizó una prueba con las condiciones optimizadas para los sedimentos marinos; sin embargo, los resultados obtenidos demostraron que tanto el volumen de surfactante como las condiciones de irradiación del microondas no eran las más adecuadas, por lo que estos factores fueron optimizados nuevamente para este tipo de matriz.

Para el proceso de optimización se utilizó un suelo procedente de un jardín (Tafira) con un contenido en materia orgánica del 4.8 % y un pH de 8.3. Se utilizaron las mismas concentraciones de surfactante que las del apartado anterior.

Suelos —		Tamaño de	nH	Materia		
	0.3 mm	0.2 mm	0.15 mm	0.1 mm		[72]
Tafira	44.4	17.2	14.6	23.8	8.3	4.8
San Roque	52.1	20.0	13.2	14.6	8.3	12.5
Santa Brígida	56.5	17.8	12.8	12.8	5.9	3.9

Tabla III.19. Características de los su	ielos estudiados.
---	-------------------

III.2.2.1.1. Efecto del volumen de surfactante

Para estudiar la influencia de este parámetro en la recuperación de los analitos se eligió una cantidad de muestra de 2 g y, en primer lugar, un volumen de surfactante de 4 mL, como en el caso de los sedimentos, utilizando una potencia de 200 W y 3 minutos en el microondas. Con 4 mL de surfactante las recuperaciones que se obtuvieron eran bajas y poco reproducibles debido, probablemente, a que las muestras de suelo no se humedecían suficientemente. Se probaron otros volúmenes de surfactante para determinar el óptimo en las

mismas condiciones. Los resultados obtenidos con los diferentes volúmenes estudiados, utilizando POLE como extractante, aparecen en la Tabla III.20.

Compuesto	Volumen de surfactante						
Compuesto	4 mL	8 mL	12 mL				
PH	80.4	116.8	150.2				
2CP	89.9	92.1	102.3				
4CP	41.1	98.3	102.0				
4-CMC	47.2	92.5	117.6				
2.4-DCP	65.6	82.7	90.2				
4-C-3.5-DMF	60.5	76.2	95.3				
2.4.6-TCP	70.0	87.7	81.2				
PCP	73.9	112.0	113.9				

Tabla III.20. Porcentajes de recuperación de clorofenoles utilizando diferentes volúmenes de POLE como extractante.

^a Media de tres determinaciones.

En dicha Tabla se observa que cuando se aumenta el volumen de surfactante añadido a la muestra de 4 a 8 mL los porcentajes de recuperación aumentan. Sin embargo, cuando se realiza la extracción con 12 mL las recuperaciones no varían apreciablemente respecto a las obtenidas con 8 mL, excepto para el PH, en este caso la recuperación es demasiado alta y creemos que se debe a la posible degradación de otros fenoles más sustituidos o a una concentración de la disolución, ya que al aumentar el volumen de extractante en el vaso del microondas la temperatura en el interior del mismo también aumenta.

III.2.2.1.2. Tiempo y potencia de irradiación

El tiempo y la potencia de irradiación del microondas se estudiaron, como en el caso anterior, mediante un diseño factorial para obtener los valores óptimos de dichos parámetros. Teniendo en cuenta los resultados de las pruebas iniciales, se empleó un diseño central compuesto de dos variables o factores con dos niveles, lo que implica once experimentos. Se eligieron como valores del tiempo 3 y 15 minutos y para la potencia 300 y 700 W.

En la Tabla III.21 se muestran los parámetros del diseño experimental y las recuperaciones obtenidas para cada clorofenol utilizando el POLE como extractante. Los valores obtenidos son satisfactorios cuando se utilizan potencias superiores a 500 W independientemente del tiempo utilizado. Las diferencias son bastante significativas para el 4-CP, ya que este compuesto solo se extrae bien, con unos valores aceptables, cuando la potencia aplicada es la máxima.

En la Tabla III.22 se presentan los coeficientes de las ecuaciones obtenidas para cada compuesto analizado, así como los coeficientes de correlación (R2) de cada una de ellas. Se puede observar que los valores de R2 para el 2-CP y el PCP son los más bajos de todos los obtenidos; sin embargo, el modelo se ajusta bien para el resto de los compuestos.

La Figura III.10 muestra la superficie de respuesta para el PH y el 2,4-DCP. A pesar de ser dos compuestos de diferentes polaridades, sus superficies de respuestas son muy similares. Los máximos se encuentran en la zona de las potencias más altas, si bien en el caso del fenol se obtienen valores del porcentaje de recuperación ligeramente más altos con tiempos mayores. Sin embargo, la diferencia es muy pequeña y no compensa aumentar el tiempo de la extracción para conseguir ese pequeño aumento. Por otra parte, hay que tener en cuenta que con tiempos muy altos algunos compuestos podrían degradarse y con ello aumentar el porcentaje de fenol obtenido. La superficie de respuesta del 2,4-DCP muestra que con una potencia de 700 W, independientemente del tiempo utilizado para realizar la extracción, se consiguen los mejores porcentajes de recuperación. Por tanto, esta potencia y un tiempo de 3 minutos fueron elegidos para realizar las aplicaciones analíticas con este surfactante.

Potencia	Tiempo		Recuperación (%)								
(VV)	(min)	<u> </u>	<u>2-CP</u>	<u>4-CP</u>	4-CMC	2,4-DCP	4-C-3,5-DMP	2,4,6-TCP	PCP		
300	3	75.5	81.4	35.9	84.1	92.3	82.1	99.0	117.4		
300	9	69.8	85.1	29.9	78.7	88.5	78.1	92.8	113.2		
300	15	66.2	81.5	20.3	74.7	87.1	80.8	96.2	109.4		
500	3	65.4	87.3	18.9	81.2	93.8	84.4	100.0	115.1		
500	9	64.2	77.0	20.9	77.4	87.6	73.5	92.7	105.9		
500	9	63.4	80.1	19.7	72.7	85.5	74.8	95.9	110.0		
500	9	60.6	74.6	19.3	71.3	82.2	70.4	89.6	102.6		
500	15	64.7	62.2	24.1	76.4	85.4	75.5	94.2	110.7		
700	3	87.3	86.7	62.9	107.2	97.5	103.3	105.7	116.6		
700	9	90.7	84.7	79.5	96.4	98.6	97.6	107.0	115.0		
700	15	91.8	86.6	76.6	96.9	98.0	94.8	101.4	110.2		

 Tabla III.21.
 Diseño de la matriz y porcentajes de recuperación obtenidos en el diseño experimental utilizando POLE como extractante.

 Tabla III.22.
 Valores de los parámetros obtenidos con el CCD para la extracción de clorofenoles con POLE.

Compuesto	β_0	β1	β2	β ₁₂	β ₁₁	β22	R ²
PH	157.36	-0.3841	-2.1258	2.88.10 ⁻³	4.07.10 ⁻⁵	0.0298	0.990
2CP	128.45	-0.2045	0.1355	-0.04.10 ⁻³	2.13.10 ⁻⁵	-0.0451	0.564
4CP	180.61	-0.7164	-1.8038	6.10.10 ⁻³	7.72.10 ⁻⁵	-0.0643	0.988
4-CMC	142.24	-0.2655	-2.6065	-0.19.10 ⁻³	3.20.10 ⁻⁵	0.1122	0.971
2.4-DCP	127.30	-0.1432	-2.0695	1.19.10 ⁻³	1.54.10 ⁻⁵	0.0618	0.878
4-C-3.5-DMF	137.51	-0.2535	-2.0708	-1.50.10 ⁻³	3.13.10 ⁻⁵	0.1279	0.974
2.4.6-TCP	122.56	-0.1060	-1.4139	-0.31.10 ⁻³	1.31.10 ⁻⁵	0.0673	0.826
PCP	144.66	-0.1020	-2.0994	0.33.10 ⁻³	1.01.10 ⁻⁵	0.0784	0.683





Figura III.10. Superficies de respuesta del PH (a) y el 2,4-DCP (b) utilizando POLE como extractante.

Para los otros surfactantes estudiados se aplicó también el diseño factorial en las mismas condiciones que las descritas para el POLE. Los resultados obtenidos se recogen en las Tablas numeradas del III.23 al III.28. Como puede observarse en todos los casos, la mayor eficacia en la extracción se obtiene cuando se utilizan potencias altas, 700 W, aunque, en general, las recuperaciones no son muy altas. En cuanto a los parámetros obtenidos con la regresión múltiple, los valores de R^2 para el Polidocanol y el $C_{12}E_6$ son ligeramente inferiores a los

que se obtienen con el POLE, sin embargo, se puede decir que para la mayoría de los compuestos estudiados se obtiene un buen ajuste con el modelo utilizado.

En las Figuras III.11 y III.12 se muestran las superficies de respuesta para el 4-C-3,5-DMP y el PH, utilizando como extractantes el polidocanol y el $C_{12}E_6$, respectivamente. En ambos casos las condiciones óptimas de extracción se encuentran en la región de potencias altas (700 W), no siendo el tiempo de extracción el parámetro crítico en este proceso.

En el caso de la utilización de Genapol X-080 como extractante, los resultados obtenidos son, en general, más bajos para la mayoría de los compuestos, excepto para el fenol (Tabla III.27). Los valores de R2 para el Genapol X-080, Tabla III.28, muestran que solamente para uno de los compuestos analizados, el 2-CP, la ecuación propuesta podría utilizarse para explicar la dependencia de la recuperación con las variables optimizadas, tiempo y potencia. Estos resultados indican unos valores aleatorios de la respuesta y podrían deberse a que el contacto entre el analito y las micelas del surfactante no fuese del todo eficaz. Debido a la mayor viscosidad que presenta, quizás habría que trabajar con disoluciones más diluidas de este surfactante o con un volumen mayor del mismo para favorecer una mejor interacción con la muestra.

Potencia	Tiempo		Recuperación (%)									
(VV)	(min)	PH	2-CP	4-CP	4-CMC	2,4-DCP	4-C-3,5-DMP	2,4,6-TCP	PCP			
300	3	87.2	57.2	44.6	60.2	47.1	46.6	49.6	65.0			
300	9	84.7	65.6	42.4	60.5	55.9	52.0	57.7	70.2			
300	15	94.7	67.8	52.2	63.6	59.3	56.5	56.3	72.4			
500	3	86.7	63.6	42.5	62.4	58.7	52.3	55.4	71.3			
500	9	87.5	58.6	42.8	64.5	64.1	55.8	54.4	70.5			
500	9	92.9	60.1	48.8	67.0	70.2	58.8	62.1	75.7			
500	9	86.3	61.9	39.1	60.8	55.0	50.6	51.6	71.3			
500	15	95.1	55.1	47.6	73.7	61.1	62.7	58.3	74.3			
700	3	87.9	63.5	46.7	74.6	55.7	58.5	63.6	72.3			
700	9	95.0	60.1	51.0	74.2	65.0	72.1	62.4	77.9			
700	15	101.4	44.7	48.9	72.8	52.8	72.5	65.1	73.2			

 Tabla III.23.
 Diseño de la matriz y porcentajes de recuperación obtenidos en el diseño experimental utilizando Polidocanol como extractante.

•

 Tabla III.24.
 Valores de los parámetros obtenidos con el CCD para la extracción de clorofenoles con Polidocanol.

Compuesto	β_0	β1	βz	β 12	β 11	β 22	R ²
PH	94.29	-0.0328	-1.0583	1.25.10 ⁻³	0.36.10 ⁻⁵	0.0694	0.923
2CP	44.98	0.0190	3.9973	-6.13.10 ⁻³	0.18.10 ⁻⁵	-0.0777	0.952
4CP	54.26	-0.0609	0.2567	-1.13.10 ⁻³	0. 77 .10 ⁻⁵	0.0400	0.683
4-CMC	54.74	0.0056	-0.1539	-1.08.10 ⁻³	0.35.10 ⁻⁵	0.0586	0.872
2.4-DCP	2.56	0.1503	4.4256	-3.15.10 ⁻³	- 1.13.10 ⁻⁵	-0.1404	0.922
4-C-3.5-DMF	54.05	-0.0639	0.8770	0.85.10 ^{.3}	0.96.10 ⁻⁵	-0.0195	0.967
2.4.6-TCP	54.42	-0.0386	1.0250	-1.08.10 ⁻³	0. 71.1 0 ⁻⁵	-0.0097	0.914
PCP	51.91	0.0343	1.7949	-1.35.10 ⁻³	-0.09.10 ⁻⁵	-0.0447	0.906

2006

Potencia	Tiempo		Recuperación (%)						
(VV)	(min) 	PH	2-CP	4-CP	4-CMC	2,4-DCP	4-C-3,5-DMP	2,4,6-TCP	PCP
300	3	69.3	79.6	33.7	79.0	79.4	72.9	92.0	94.8
300	9	56.5	73.1	21.1	57.3	67.0	55.0	70.1	69.6
300	15	61.6	64.1	20.9	42.8	53.1	39.5	57.4	53.5
500	3	71.6	76.1	38.4	78.2	76.5	67.8	86.0	90.1
500	9	63.2	61.4	30.0	51.1	59.0	48.5	60.5	52.1
500	9	64.5	56.3	30.6	57.6	56.1	53.5	64.1	66.5
500	9	60.4	59.6	25.7	37.7	48.5	29.4	44.1	37.0
500	15	63.6	60.4	27.7	77.4	81.9	70.6	88.6	93.9
700	3	84.6	83.8	71.1	108.1	92.7	95.6	98.8	104.7
700	9	87.8	81.9	77.2	97.3	93.7	90.4	100.0	113.1
700	15	88.8	83.7	74.6	97.8	93.1	88.0	95.0	117.1

Tabla III.25. Diseño de la matriz y porcentajes de recuperación obtenidos en el diseño experimental utilizando $C_{12}E_6$ como extractante.

Tabla III.26. Valores de los parámetros obtenidos con el CCD para la extracción de clorofenoles con $C_{12}E_{6}$.

Compuesto	$oldsymbol{eta}_0$	β1	βz	β ₁₂	β ₁₁	β22	R²
PH	111.9	-0.184	-3.75	2.48.10 ⁻³	2.23.10 ⁻⁴	0.122	0.958
2CP	165.6	-0.345	-4.72	3.21.10 ⁻³	3.44.10-4	0.125	0.924
4CP	110.4	-0.373	-3.51	3.40.10 ⁻³	4.65.10-4	0.0 7 0	0.985
4-CMC	172.7	-0.337	-12.10	5.40.10 ⁻³	3.92.10-4	0.449	0.866
2.4-DCP	159.7	-0.294	-8.99	5.56.10 ⁻³	3.11.10-4	0.313	0.798
4-C-3.5-DMF	168.2	-0.365	-10.11	5.38.10 ⁻³	4.05.10-4	0.353	0.812
2.4.6-TCP	183.9	-0.317	-11.76	6.42.10 ⁻³	3.22.10-4	0.420	0.734
PCP	230.7	-0.478	-16.11	11.19.10 ⁻³	4.74.10-4	0.545	0.789

2006

Potencia	Tiempo		Recuperación (%)						
(W)	(min)	PH	2-CP	4-CP	4-CMC	2,4-DCP	4-C-3,5-DMP	2,4,6-TCP	PCP
300	3	72.7	63.2	28.4	37.6	37.2	35.5	24.7	31.8
300	9	71.6	48.3	37.5	47.3	44.7	49.4	45.4	47.9
300	15	65.8	30.2	18.4	17.3	16.0	15.1	7.4	9.2
500	3	76.0	62.2	27.2	24.8	25.6	21.7	12.0	18.0
500	9	70.0	49.4	26.3	34.7	36.1	36.7	30.0	31.0
500	9	66.8	30.9	27.3	31.0	32.5	31.0	19.2	24.7
500	9	66.8	30.9	27.3	31.0	32.5	31.0	19.2	24.7
500	15	80.8	34.5	45.4	42.2	33.6	38.0	23.8	34.5
700	3	69.4	55.7	27.7	29.6	32.5	24.8	19.6	43.5
700	9	72.3	43.4	35.4	34.7	32.7	31.0	20.8	22.6
700	15	77.1	25.8	38.2	41.3	29.6	37.6	20.7	31.1
			·						

 Tabla III.27.
 Diseño de la matriz y porcentajes de recuperación obtenidos en el diseño experimental utilizando Genapol X-080 como extractante.

 Tabla III.28.
 Valores de los parámetros obtenidos con el CCD para la extracción de clorofenoles con Genapol X-080.

Compuesto	βo	β ₁	β2	β 12	β ₁₁	β ₂₂	R ²
PH	77.86	0.0256	-3.6758	3.04 <i>.</i> 10 ⁻³	-0.46.10 ⁻⁵	0.1284	0.564
2CP	92.74	-0.0630	-4.9527	0.65.10 ⁻³	0.43.10 ⁻⁵	0.1174	0.811
4CP	39.63	-0.0297	-1.6489	4.27.10 ⁻³	0.05.10 ⁻⁵	0.0018	0.377
4-CMC	70.15	-0.1340	-0.8757	6.67.10 ⁻³	0. 77 .10 ⁻⁵	-0.1230	0.464
2.4-DCP	53.58	-0.0859	1.2163	3.81.10 ⁻³	0.49.10 ⁻⁵	-0.1983	0.504
4-C-3.5-DMF	65.42	-0.1331	0.6504	6.92.10 ⁻³	0.65.10 ⁻⁵	-0.2148	0.526
2.4.6-TCP	58.28	-0.1728	3.0690	3.83.10 ⁻³	1.25.10 ⁻⁵	-0.2838	0.428
PCP	64.38	-0.1471	0.2249	2.13.10 ⁻³	1.35.10-5	-0.1001	0.150



Figura III.11. Superficie de respuesta para el 4-C-3,5-DMP utilizando Polidocanol como extractante.



Figura III.12. Superficie de respuesta del PH utilizando $C_{12}E_6$ como extractante.

2006

III. 2.2.1.3. Influencia del pH

Al igual que con los sedimentos, cuando se modifica el pH de la disolución extractante hacia medios más básicos, los analitos más polares, como el PH y el 2-CP, mejoran ligeramente sus porcentajes de recuperación; para el resto de los derivados fenólicos esta modificación del pH no tiene ninguna influencia sobre la eficacia de la extracción. Hay que destacar, además, que al aumentar el pH de la disolución extractante se consiguen extractos más oscuros, debido a la extracción de los ácidos húmicos presentes en los suelos. Este hecho podría repercutir negativamente en la determinación de los analitos debido a un aumento de interferencias en el cromatograma. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos decidimos no modificar el pH de la disolución extractante.

III.2.2.1.4. Influencia de la concentración de analito en la muestra

Puesto que podemos encontrarnos con diferentes concentraciones de fenoles, en diferentes muestras de suelos, es importante conocer la influencia de este parámetro en la extracción. Con objeto de comprobar si una modificación en la concentración de analito podría provocar cambios en las condiciones óptimas de la extracción, se realizaron un conjunto de experimentos utilizando un intervalo de concentraciones de clorofenoles entre 0.5 y 4 μ g.L⁻¹ en las condiciones de extracción previamente optimizadas.

Los resultados obtenidos muestran que en el intervalo de concentraciones estudiado no se aprecian diferencias significativas en los porcentajes de recuperación obtenidos.

III. 2.2.2. PARÁMETROS ANALÍTICOS Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Para evaluar la precisión del método desarrollado se utilizaron seis muestras de suelo (Tafira). Dichas muestran se acondicionaron con la mezcla de quince fenoles y se sometieron al proceso de extracción por microondas utilizando

el surfactante polioxietilen 10 lauril éter como extractante, en las condiciones experimentales optimizadas.

En la Figura III.13 se muestra el cromatograma obtenido. Este surfactante fue el elegido para realizar las aplicaciones analíticas puesto que fue el que mejores resultados proporcionó.



Figura III.13. Cromatograma del extracto de muestras de suelo de Tafira.

La Tabla III.29 muestra los porcentajes de recuperación obtenidos, la desviación estándar para cada uno de los fenoles estudiados y sus respectivos límites de detección. Las recuperaciones obtenidas son bastante satisfactorias, ya que once de los quince compuestos pueden ser extraídos con porcentajes del

80% o superiores. Los compuestos con uno, dos o tres grupos metilo se extraen deficientemente en este tipo de suelos, debido, probablemente, a su textura, puesto que las muestras recogidas en Tafira presentan un mayor porcentaje de grano pequeño que las otras. Un tamaño de grano menor implica un mayor contenido en arcillas y esto supone una mayor adsorción de los analitos en las partículas del suelo.

Para todos los analitos, los valores de la desviación estándar son inferiores a 8.1, excepto para el PC y el 2,4,6-TMP, que presentan valores muy superiores debido a su peor extracción. Los límites de detección obtenidos están comprendidos entre 2 y 22 μ g.L⁻¹.

Analito	Recuperación (%) ^ª	RSD (%)	LOD (µg.L ⁻¹)
PH	79.6	4.1	10
4-NP	92.1	2.2	3
2,4-DNP	106.0	2.5	4
PC	8.7	20.7	14
2-NP	80.6	1.5	5
2CP	86.0	4.5	7
4CP	61.9	8.1	8
2,4-DMP	15.9	6.0	2
4,6-DNOC	97.9	1.9	2
4-CMC	88.0	2.7	10
2,4,6-TMP	5.1	17.1	14
2,4-DCP	98.9	4.6	12
4-C3,5-DMP	95.1	4.3	14
2,4,6-TCP	91.9	1.4	11
PCP	105.1	4.0	22

 Tabla III.29.
 Porcentajes de recuperación, desviación estándar y límites de detección para la extracción de derivados fenólicos en muestras se suelo usando MAME con POLE.

^a Media de tres determinaciones.

El método oficial para la extracción de fenoles en muestras de suelo es la metodología Soxhlet [73-75], la cual requiere la utilización de disolventes orgánicos y un mayor tiempo de extracción. Con objeto de validar el método de extracción propuesto se realizó la extracción Soxhlet de muestras de suelo de Tafira, previamente acondicionadas con la mezcla de quince fenoles según las condiciones que se indican en la Parte Experimental.



Figura III.14. Comparación entre la extracción Soxhlet y MAME para muestras de suelo de Tafira con 24 horas de acondiconamiento.

En la Figura III.14 se muestran los resultados obtenidos con ambos métodos. Los compuestos más polares, los que aparecen al principio del cromatograma, no se pudieron cuantificar debido a interferencias en esta parte del cromatograma en el caso de los extractos obtenidos al emplear la extracción Soxhlet. Como se puede observar, los valores obtenidos mediante MAME son similares a los que se obtienen con Soxhlet, excepto para el 2,4-DCP y el 2,4,6-

TMP. El primero se extrae mejor utilizando la extracción asistida por microondas, mientras que del segundo se recupera más de un 50 % utilizando la extracción Soxhlet. Los analitos con grupos metilo en la molécula quedan más fuertemente retenidos en las partículas del suelo, por lo que las condiciones optimizadas para los clorofenoles parecen no ser las más idóneas para la extracción de este tipo de compuestos. La menor recuperación del 2,4-DCP con el Soxhlet creemos que puede ser debida a que en las condiciones en las que se realiza la extracción, con largos tiempo de calentamiento, se puede producir una degradación de este compuesto en otro más sencillo.

III.2.2.3. APLICACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN POR MICROONDAS CON MEDIOS MICELARES A MUESTRAS DE SUELOS

Tras optimizar los factores de los que depende el método de extracción por microondas, diferentes muestras de suelos fueron sometidas al mismo utilizando el surfactante POLE como extractante. Estos suelos proceden de diferentes zonas de la isla de Gran Canaria y presentan características diferentes: tamaño de grano, porcentaje de materia orgánica y pH, descritas previamente en la Tabla III.19. Las muestras fueron previamente acondicionadas, tal y como se explica en la Parte Experimental, con la mezcla de quince fenoles. En la Figura III.15 se muestran los cromatogramas de los extractos de muestras de suelo de San Roque sin acondicionar y acondicionada con la mezcla de fenoles.

Los porcentajes de recuperación obtenidos, media de las determinaciones en tres muestras independientes, se muestran en la Figura III.16. Las muestras procedentes de Santa Brígida y de Tafira poseen un contenido similar en materia orgánica pero diferente pH. Los compuestos con grupos metilo, como el PC, 2,4-DMP y el 2,4,6-TMP, se extraen mejor en las muestras procedentes de Santa Brígida, con un pH más ácido. Para el resto de los compuestos estudiados apenas hay diferencias entre los porcentajes de

extracción conseguidos en ambos tipos de suelos.



Figura III.15. Cromatogramas de los extractos de muestras de suelo de San Roque sin acondicionar (a) y acondicionada con la mezcla de 15 fenoles (b).



Figura III.16. Porcentajes de recuperación de los derivados fenólicos obtenidos al aplicar MAME a diferentes muestras de suelos.

Cuando se comparan los valores obtenidos para las muestras de Tafira y San Roque, igual pH y diferente contenido en materia orgánica, se observa que los compuestos mencionados anteriormente, los alquilfenoles, se extraen mejor en el suelo con mayor contenido en materia orgánica. En la bibliografía relativa a la absorción de este tipo de compuestos en suelos se explica que los compuestos con grupos metilo quedan más retenidos en aquellos suelos con alto contenido en materia orgánica [55]. Sin embargo, los resultados obtenidos en las muestras de San Roque muestran un comportamiento totalmente diferente. Creemos que esta diferencia se debe fundamentalmente a dos factores. En primer lugar, las muestras de suelo procedentes de Tafira tienen un mayor porcentaje de partículas con un tamaño menor, es decir, probablemente su contenido en arcillas es superior al de las otras muestras investigadas. Las arcillas retienen más a los analitos que los otros constituyentes del suelo, ya que cuanto menor sea el tamaño de partícula mayor será el área superficial y, por tanto, la interacción; de ahí que las recuperaciones obtenidas sean más bajas para este tipo de suelos. Por otra parte, los fenoles pueden absorberse sobre las sustancias húmicas y ser extraídos conjuntamente con éstas, puesto que los surfactantes han demostrado ser buenos extractantes de ácidos húmicos y fúlvicos. Como consecuencia de ello, en aquellos suelos con un alto contenido en materia orgánica, la utilización de surfactantes favorece la extracción de los analitos.

Por tanto, puede concluirse que el factor determinante en la absorción de estos fenoles en los suelos estudiados es la textura de los mismos, más que su pH o contenido en materia orgánica.

Cuando se estudió la extracción de fenoles en sedimentos marinos los resultados fueron similares, es decir, los mejores porcentajes de recuperación se consiguieron en sedimentos con un mayor tamaño de partícula. En estos sedimentos el contenido en materia orgánica era menor, por lo que no se podía establecer la mayor o menor influencia de ambos factores, textura y contenido en materia orgánica, en la absorción de los analitos.

III.2.2.3.1. Aplicación del proceso MAME a muestras de suelos envejecidas

Cuando se realiza la extracción de contaminantes de muestras de suelos, los porcentajes de extracción disminuyen con el tiempo de envejecimiento de las mismas [52]. Esto es debido a que a medida que aumenta el tiempo de contacto entre los analitos y las partículas del suelo las fuerzas que se establecen entre ambos son diferentes. En la primeras etapas los analitos son incorporados mediante adsorción, es decir, quedan retenidos en la superficie externa de las partículas del suelo, prevaleciendo las fuerzas de van der Waals. Estas fuerzas, las más débiles entre las interacciones moleculares, aumentan su intensidad con el tamaño de la partícula, por lo que este factor tiene cierta influencia en la adsorción de los analitos. A medida que transcurre el tiempo, las moléculas de los contaminantes se incorporan a la estructura interna de las partículas del suelo. A este fenómeno de le denomina absorción. A veces se utiliza también el término "secuestración" para referirse a este mecanismo [53,71].

La influencia del tiempo de envejecimiento en la extracción de los derivados fenólicos en suelos fue estudiada analizando muestras de los tres tipos de suelos en diferentes períodos de tiempo, hasta ocho semanas después de ser acondicionadas. Como se comentó anteriormente, cuando se extraen analitos de muestras envejecidas los porcentajes de recuperación van disminuyendo con el tiempo de contacto entre los analitos y las partículas del suelo; por esta razón se aumentó la concentración de los analitos en las muestras envejecidas respecto a las frescas.

En la Figura III.17 se representan las variaciones en los porcentajes de recuperación de los derivados fenólicos, agrupados según los sustituyentes presentes en la molécula, correspondientes a muestras de suelo de San Roque. Para los nitro y clorofenoles, los porcentajes de recuperación disminuyen notablemente con el tiempo de contacto entre los analitos y las partículas del suelo en los dos primeras semanas de acondicionamiento. Después de este tiempo la cantidad de analito extraído es prácticamente la misma. Sin embargo, en los alquilfenoles el comportamiento es sensiblemente diferente, destacando el caso del PC, para el cual las recuperaciones aumentan con el tiempo a partir de un mes después del acondicionamiento.

Para las tres familias puede observarse que los compuestos más ligeros de cada grupo, con un solo sustituyente en la molécula además del grupo hidroxilo, aumentan sus porcentajes de recuperación después de cierto tiempo. Creemos que este hecho puede deberse a una posible degradación de los analitos más sustituidos de la mezcla, a consecuencia de transformaciones químicas o por la acción microbiana [18,29].





2008

Los compuestos que poseen otros grupos o átomos en la molécula además de los grupos metilo no se comportan como alquilfenoles: el 4,6-DNOC se comporta como un nitrofenol y el 4-C-3,5-DMP, a pesar de poseer dos grupos metilos, se comporta como un clorofenol. Este comportamiento de los derivados fenólicos estudiados es similar al obtenido en las otras muestras de suelo investigadas.



Figura III.18. Porcentajes de recuperación de los derivados fenólicos obtenidos al aplicar MAME a diferentes muestras de suelo después de 8 semanas de acondicionamiento.

En la Figura III.18 se muestran los porcentajes de recuperación de los quince fenoles presentes en la mezcla, tras 8 semanas de acondicionamiento, en los tres tipos de suelo investigados. Como en el caso de las muestras frescas los mejores resultados se obtienen en las de San Roque. A pesar del tiempo

transcurrido, once de los quince fenoles pueden ser extraídos con porcentajes de recuperación próximos o superiores al 75 %.

III.2.2.3.2. Comparación de MAME con la extracción Soxhlet para muestras de suelos envejecidas

Siguiendo la misma sistemática de trabajo que se empleó con las muestras frescas, muestras de suelo de Tafira, previamente acondicionadas con la mezcla de quince fenoles, fueron utilizadas para comparar el método de extracción desarrollado con el de extracción Soxhlet, después de un tiempo de envejecimiento. Los fenoles fueron extraídos ocho semanas después de ser acondicionadas las muestras. En la Figura III.19 se muestran los resultados obtenidos con ambos métodos.

2006



Figura III.19. Comparación de MAME con la extracción Soxhlet para muestras envejecidas (8 semanas) de suelo de Tafira.

Al igual que con las muestras frescas, los compuestos más polares no se pudieron cuantificar en los extractos del Soxhlet. Se puede observar que los valores obtenidos mediante MAME son similares a los que se obtienen con el Soxhlet, excepto para el 2,4-DMP. Este compuesto es líquido a temperatura ambiente y es posible que durante el proceso de extracción alguna cantidad se perdiese por volatilización. Podemos concluir que el método desarrollado es aplicable a la determinación de fenoles en muestras de suelos contaminadas, con igual eficacia que los métodos convencionales, pero con la ventaja de no utilizar disolventes orgánicos y emplear un menor tiempo de análisis.

III.2.2.4. APLICACIÓN DEL PROCESO MAME A UNA MUESTRA DE SUELO CERTIFICADA

Algunos autores consideran que las recuperaciones obtenidas con muestras enriquecidas no son comparables a las obtenidas con muestras reales debido a los procesos e interacciones que tienen lugar en este tipo de muestras [76-78]. Los analitos añadidos son ligeramente retenidos en la superficie de la matriz, mientras que los contaminantes nativos son más fuertemente retenidos en el interior de los poros de la matriz. Por ello, los resultados obtenidos en la eficiencia de la extracción en muestras acondicionadas pueden ser sobreestimados. Esta es la razón por la que es importante validar el proceso de extracción desarrollado aplicándolo a un material certificado. Con este fin, se adquirió un material de referencia certificado conteniendo ocho de los fenoles estudiados. La textura de la muestra de suelo era arenosa (marga), con un pH de 6.96 y se obtuvo de un centro de tratamiento de madera en la región de las Montañas Rocosas, E.E.U.U. Las concentraciones de cada uno de los fenoles fue certificada mediante USEPA SW846, 3rd edición, método 8041.

En la Figura III.20 se muestra el cromatograma obtenido a partir de un extracto de este material certificado después aplicar la extracción asistida por microondas a una muestra del mismo, utilizando POLE como extractante.

2006

La Tabla III.30 muestra los fenoles presentes en la muestra, los valores de concentración certificados, los intervalos de predicción y los valores de concentración obtenidos al aplicar MAME a muestras de este material certificado. Se utilizaron dos gramos de muestra y se les aplicó las condiciones optimizadas de potencia y tiempo. Con objeto de soslayar las interferencias provocadas por otras sustancias presentes en el material de referencia se utilizó el método de las adiciones estándar para la obtención de los valores de concentración. Como se puede observar, las concentraciones obtenidas están muy próximas a los valores del intervalo de predicción y la desviación estándar relativa de cada uno de los fenoles resulta ser menor que la del valor certificado.



Figura III.20. Cromatograma del extracto obtenido al aplicar MAME al material certificado.

Compuesto	Concentración certificada	R.S.D. ^b	Intervalo de predicción	Concentración encontrada ^c
РН	2.45	1.63	1.35 - 3.55	1.19 ± 0.026
4-NP	5.66	4.32	2.56 - 8.76	9.57 ± 0.003
2-NP	4.33	2.75	2.40 - 6.27	2.34 ± 0.006
2-CP	2.38	1.44	1.35 - 3.41	1.15 ± 0.019
4.6-DNOC	4.75	4.53	2.35 - 7.15	7.56 ± 0.007
4-CMC	4.94	2.80	3.04 - 6.84	2.64 ± 0.004
2.4-DCP	2.53	1.11	1.69 - 3.37	3.21 ± 0.009
PCP	5.05	4.05	2.12 - 7.98	3.40 ± 0.006

 Tabla III.30.
 Datos de la muestra certificada y valores de concentración obtenidos al aplicar

 MAME ^a.

^a Todos los valores están expresados en mg.kg ⁻¹; ^b Desviación estándar relativa de los valores certificados; ^c Media de tres determinaciones.

III.3. BIBLIOGRAFÍA

- 1. O. P. Heemken, T. Norbert, B.W. Wendawiak, Anal. Chem., 69 (1997) 2171.
- 2. J. Snyder, R. Grob, M. McNally, T. Oostdyk, Anal. Chem., 64 (1992) 1940.
- 3. H. B. Wan, M.K. Wong, J. Chromatogr. A 754 (1996) 43.
- 4. C. F. Poole, S.K. Poole, Anal. Comm. 33 (1996) 11H.
- 5. S. B. Hawthorne, Anal. Chem. 62 (1990) 633A.
- 6. S. Bøwadt, S.B. Hawthorne, J. Chromatogr. A 703 (1995) 549.
- 7. R. M. Smith, J. Chromatogr. A 856 (1999) 83.
- 8. E. Bjorklund, S. Bøwadt, T. Nilsson, Trends Anal. Chem. 19 (2000) 434.
- 9. V. López-Ávila, Crit. Rev. Anal. Chem. 29 (1999) 195.
- 10. M. Letellier, H. Budzinski, Analusis 27 (1999) 259.
- 11. V. Camel, Trends Anal. Chem. 19 (2000) 229.
- 12. A. Abu-Samra, J.S. Morris, S.R. Koirtyohann, Anal. Chem. 47 (1975) 1475.
- ASTM D5258, Standard Test Method For Acid Extraction of Elements from Sediments using Closed Vessel Microwave Heating, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, 1996.
- ASTM D5765, Standard Practice for Solvent Extraction of Total Petroleum Hydrocarbons from Soils and Sediments using Closed Vessel Microwave Heating, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, 1996.
- ASTM D6010, Standard Practice for Closed Vessel Microwave Solvent Extraction of Organic Compounds from Solid Matrices, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, 1996.
- EPA Method 3546, Microwave Extraction of VOC's and SVOC's (Organophosphorus pesticides, Organochlorine pesticides, Chlorinated herbicides, Phenoxy Acid Herbicides, PCBs, etc.), EPA SW-846 update III, US Environmental Protection Agency, 1999.
- 17. K. Ganzler, A. Salgo, K. Valko, J. Chromatogr. 371 (1986) 299.
- 18. V. López-Ávila, R. Young, W.F. Beckert, Anal. Chem. 66 (1994) 1097.
- 19. D. R. Baghurst, D.M.P. Mingos, J. Chem. Soc., Chem. Commun. (1992) 674.

- 20. M. P. Llompart, R.A. Lorenzo, R. Cela, J.R. Jocelyn Paré, Analyst, 122 (1997) 133.
- 21. A. Egizabal, O. Zuloaga, N. Etxebarria, L.A. Fernandez, J.M. Madariaga, Analyst 123 (1998) 1679.
- V. Pino, J.H. Ayala, A.M. Afonso, V. Gonzalez, J. Chroma togr. A 869 (2000) 515.
- 23. N. Alexandrou, J. Pawliszyn, Anal. Chem. 61 (1989) 2770.
- I. Silgoner, R. Krska, E. Lombas, O. Gans, E. Rosenberg, M. Grasserbauer, Fresenius J. Anal. Chem. 362 (1998) 120.
- 25. N. Font, F. Hernandez, E.A. Hogendoorn, R.A. Baumann, P. van Zoonen, J. Chromatogr. A 798 (1998) 179.
- 26. A. Pastor, E. Vazquez, R. Ciscar, M. de la Guardia, Anal.Chim. Acta 344 (1997) 241.
- K.L. Ackley, C. B'Hymer, K.L. Sutton, J.A. Caruso, J. Anal. Atom. Spectrom. 14 (1999) 845.
- 28. S.J. Stout, A.R. Dacunha, D.G. Allardice, Anal. Chem. 68 (1996) 653.
- V. López-Ávila, R. Young, J. Benedicto, P. Ho, R. Kim, W.F. Beckert, Anal. Chem. 67 (1995) 2096.
- 30. K.K. Chee, M.K. Wong, H.K. Lee, J. Chromatogr. A 736 (1996) 211.
- M.M. Punt, G.S.V. Raghavan, J.M.R. Belanger, J.R.J. Pare, J. Soil Contam. 8 (1999) 577.
- E. Vazquez Blanco, P. Lopez Mahia, S. Muniategui Lorenzo, D. Prada Rodriguez, E. Fernandez Fernandez, Fresenius J. Anal. Chem. 366 (2000) 283.
- 33. I.J. Barnabas, J.R. Dean, I.A. Fowlis, S.P. Owen, Analyst 120 (1995) 1897.
- J.R.J. Pare, J.M.R. Belanger, S.S. Stafford, Trends Anal. Chem. 13 (1994) 176.
- C. Sparr Eskilsson, E. Bjorklund, L. Mathiasson, L. Karlsson, A. Torstensson, J. Chromatogr. A 840 (1999) 59.
- A. Kovacs, K. Ganzler, L. Simon-Sarkadi, Z. Lebensm, Unters Forsch. A 207 (1998) 26.
- 37. B. Enders, G. Schwedt, GIT Fachz. Lab. 40 (1996) 172.
- M. P. Llompart, R.A. Lorenzo, R. Cela, J.R. Jocelyn Pare, J.M.R. Belanger, K. Li, J. Chromatogr. A 757 (1997) 153.
- 39. K.K. Chee, M.K. Wong, H.K. Lee, J. Chromatogr. A 723 (1996) 259.
- 40. K. Chee, M.K. Wong, H.K. Lee, Environ. Monit. Assess. 44 (1997) 587.
- 41. L. Pensado, C. Casais, C. Mejuto, R. Cela, J. Chromatogr. A 869 (2000) 505.
- 42. R. Hoogerbrugge, C. Molins, R.A. Baumann, Anal. Chim. Acta 348 (1997) 247.
- 43. C. Sparr Eskilsson, E. Björklund, J. Chromatogr. A 902 (2000) 227.
- 44. H.M.J. Pylypiw, T.L. Arsenault, C.M. Thetford, M.M.J. Incorvia, J. Agric. Food Chem. 45 (1997) 3522.
- 45. B. Perez-Cid, I. Lavilla, C. Bendicho, Anal. Chim. Acta 378 (1999) 201.
- 46.] G. Xiong, J. Liang, S. Zou, Z. Zhang, Anal. Chim. Acta 371 (1998) 97.
- 47. K.K. Chee, M.K. Wong, H.K. Lee, Chromatographia 42 (1996) 378.
- 48. F.I. Onuska, K.A. Terry, Chromatographia 36 (1993) 191.
- 49. S.J. Stout, B.W. Babbitt, A.R. DaCunha, M.M. Safarpour, J. AOAC Int. 81 (1998) 1054.
- 50. J.J. Langenfeld, S.B. Hawthorne, D.J. Miller, J. Pawliszyn, Anal. Chem. 67 (1995) 1727.
- 51. E. Bjorklund, S. Bøwadt, L. Mathiasson, S.B. Hawthorne, Environ. Sci. Technol. 33 (1999) 2193.
- 52. S.B. Hawthorne, E. Bjorklund, S. Bøwadt, L. Mathiasson, Environ. Sci. Technol. 33 (1999) 3152.
- 53. F. Kopinke, J. Pörschmann, U. Stottmeister, Environ. Sci. Technol., 29 (1995) 941.
- 54. V. Lopez-Avila, R. Young, W.F. Beckert, J. AOAC Int. 81 (1998) 462.
- 55. M.A. Crespín, M. Gallego, M. Varcárcel, J. Chromatogr. A, 897 (2000) 279.
- 56. J. Pörschmann, U. Stottmeister, Chromatographia 36 (1993) 207.
- 57. V. Camel, Trends Anal. Chem., 19 (2000) 229.
- 58. A. Bianco Prevot, M. Gulmini, V. Zelano, E. Pramauro, Anal. Chem. 73

Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

C Del documento, los autores.

(2001) 3790.

- 59. V. Pino, J.H. Ayala, A.M. Afoso, V. González, Inter. J. Envirn. Anal. Chem. 81 (2001) 281.
- 60. V. Pino, J.H. Ayala, A.M. Afoso, V. González, Anal. Chim. Acta 477 (2003) 81.
- A. Eiguren Fernández, Z. Sosa Ferrera and J.J. Santana Rodríguez, Anal. Chim. Acta 433 (2001) 237.
- 62. A. Eiguren Fernández, Z. Sosa Ferrera and J.J. Santana Rodríguez, Chromatographia 53 (2001) 375.
- C. Padrón Sanz, A. Eiguren Fernández, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodríguez, J. AOAC Internacional 85(1) (2002) 44.
- C. Padrón Sanz, Z. Sosa Ferrera and J.J. Santana Rodríguez, Anal. Letters, 37(7) (2004) 1.
- 65. P.W. Araujo, R.G. Brereton, Trends Anal. Chem. 15 (1996) 63.
- 66. A. Gustavo González, Anal. Chim. Acta 360 (1998) 227.
- 67. A. Gustavo González, D. González-Arjona, Anal. Chim. Acta 298 (1994) 65.
- 68. M.T. Galcerán, O. Jáuregui, Anal. Chim. Acta, , 304 (1995) 75.
- 69. A.DiCorcia, S. Marchese, R. Samperi, J AOAC INT., 77 (1994) 446.
- 70. N.M. Laine, H. Haario, K.S. Jorgensen, J. Microbiol. Methods 30 (1997) 21.
- 71. J. Dec, J. Bollag, Soil Sci., 162 (1997) 858.
- F. Guitian Ojea, T. Carballas fernandez, "Técnicas de análisis de suelos" Pico sacro. Santiago de compostela (1976).
- 73. EPA Method 604 Part VIII, 40 cFR Part 136, Environmental Protection Agency, Washington, DC (1984) p. 58.
- 74. EPA Method 625, Part VIII, 40 cFR Part 136, Environmental Protection Agency, Washington, DC (1984) p. 153.
- 75. EPA Method 8041, Environmental Protection Agency, Washington, DC (1995) p. 1.
- 76. M.D.Burford, S.B. Hawthorne, D.J. Miller, Anal. Chem., 65 (1993) 1497.
- B.E. Richter, B.A. Jones, J.L. Ezzel, N.L. Porte, N. Avdanovic, C. Pohl, Anal. Chem., 68 (1996) 1033.

177

78. S. Dupeyron, P.M. Dudermel, D. Counturier, Analusis, 25 (1997) 286.

CAPÍTULO IV

PARTE EXPERIMENTAL

IV.1. APARATOS

IV.1.1. Cromatografía líquida de alta resolución

Para la determinación cromatográfica se utilizó un sistema compuesto por dos bombas Waters 510, un inyector Rheodyne 7725i y un detector ultravioletavisible de diodos modelo 996, también de Waters (Waters Cromatografía S.A. Barcelona, España). La columna utilizada fue una Nova-pack C18, 3.9 x 150 mm (con relleno de partículas de 4 μ m) de Waters. El software utilizado para la obtención de los cromatogramas y su posterior tratamiento fue Millenium 2.15 de Waters.

Para el tratamiento estadístico de los datos se hizo uso del Software Statqraphics de Statistical Graphics Corporation, así como del programa Excel de Microsoft.

IV.1.2. Control de temperatura

El proceso de extracción por *punto de nube* se realizó utilizando un baño termostatizado de la marca Selecta (Barcelona, España), modelo Tectron 3473200. La separación de las fases se llevó a cabo centrifugando las muestras en una centrífuga marca Selecta, modelo Mixtasel.

IV.1.3. Microondas

El equipo de extracción consistió en un sistema de digestión por microondas modelo Multiwave B30MC06A, de la marca Anton Paar, (Graz, Austria), con control de tiempo y potencia, rotor 6EVAP, con una frecuencia de 2450 MHz a potencia total, con 6 vasos de PFA, modelo MF100, para un volumen máximo de 50 mL.

IV.2. REACTIVOS

Los fenoles utilizados en la Tesis, indicados en la Tabla 2, son de la marca Fluka y fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Madrid, España).

Los surfactantes polioxietilénicos, polioxietilen 10 lauril éter (POLE), polioxietilen 9 lauril éter (Polidocanol), polioxietilen 6 lauril éter (de la marca Sigma) y el Genapol X-080 (de la marca Fluka), fueron suministrados también por Sigma-Aldrich (Madrid, España).

La mezcla de fenoles certificada nº X190103 de Laboratories Dr. Ehrenstorfer GmbH (Alemania) se adquirió en Imatra (Barcelona, España). La muestra de suelo certificada conteniendo fenoles fue suministrada por LGC Promochen (Barcelona, España). La muestra era arenosa (marga), con un pH de 6.96 y se obtuvo de un centro de tratamiento de madera en la región de las Montañas Rocosas, USA. Las concentraciones de cada uno de los fenoles fue certificada mediante USEPA SW846, 3rd edición, método 8041.

Para modificar el pH se utilizó ácido acético glaciar, calidad "pro análisis" de la marca Merck. La fuerza iónica del medio se modificó añadiendo a las disoluciones cloruro sódico de la marca Panreac. El metanol utilizado para la preparación de las disoluciones, así como para la fase móvil, fue de la marca Panreac (grado HPLC). 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.

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

IV.3. DISOLUCIONES

Las disoluciones patrón de los fenoles se prepararon disolviendo las cantidades adecuadas de cada uno de ellos en metanol, a excepción del 2clorofenol y el 2,4-dimetilfenol, de los que se tomó el volumen necesario para conseguir la concentración final requerida. Se prepararon disoluciones de 200 mg.L⁻¹ y, a partir de éstas, otras de menor concentración.

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

IV.4. PROCEDIMIENTOS

IV.4.1. Determinación de la concentración micellar crítica

La concentración micelar crítica se determinó por medidas de conductividad. Para ello se parte de una disolución acuosa a la cual se van añadiendo diferentes volúmenes de una disolución concentrada del surfactante en estudio. Mediante la conductividad medida de forma directa sobre las diferentes disoluciones, cuya concentración en surfactante va aumentando, se calcula la conductividad real. Esta se obtiene mediante la expresión

Conductividad real = conductividad medida x [(V_{inicial} + V_{añadido})/V_{inicial}]

La representación gráfica de estos valores experimentales de la conductividad frente a la concentración de surfactante en disolución nos permite obtener la *concentración micelar crítica*. Este valor se obtiene de la intersección de las tangentes trazadas en los dos tramos de la curva obtenida.

IV.4.2. Determinación de la temperatura de punto de nube

Para obtener la temperatura crítica de cada surfactante preparamos

disoluciones con concentraciones diferentes de los mismos en tubos de ensayo. Estos tubos se introdujeron en un baño termostatizado y la temperatura de dicho baño se fue aumentando gradualmente 5°C cada 10 minutos. La aparición de turbidez permanente nos indicó la presencia de dos fases en la disolución. La temperatura a la cual se produce este fenómeno es la temperatura de *punto de nube* o temperatura de *cloud point* del surfactante a esa concentración.

Si representamos gráficamente la *temperatura de nube* de cada surfactante frente a su concentración obtenemos una curva. La temperatura crítica del surfactante coincide con el punto de intersección de las tangentes a los tramos de dicha curva. Los resultados que se representan corresponden al valor medio de tres medidas independientes.

IV.4.3. Determinación de la relación de volúmenes

La relación de volúmenes, fase acuosa y fase rica en surfactante, bajo diferentes condiciones experimentales, se determinó colocando en tubos graduados de 10 mL la disolución de surfactante y sometiéndola a las condiciones de formación del *punto de nube*. Una vez que la separación de fases se produce se mide el volumen de cada una de las fases. Los resultados que se muestran corresponden al valor medio de tres determinaciones independientes.

IV.4.4. Análisis cromatográfico

El análisis cromatográfico de fenoles 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 siempre de 20 µL y por triplicado para asegurar el llenado completo del inyector. Los tiempos de retención obtenidos corresponden al valor medio de cinco determinaciones.

IV.4.5. Extracción y preconcentración de fenoles en muestras líquidas por *Punto de Nube*

Disoluciones de fenoles en los diferentes surfactantes estudiados, con la

concentración elegida, se mantienen en un baño termostatizado a temperatura constante (15°C por encima de la temperatura de *punto de nube* de cada surfactante) durante diferentes periodos de tiempo. Una vez fuera del baño, los tubos se introdujeron en la centrífuga durante 5 minutos a 3500 rpm. A fin de evitar que las fases se mezclasen por un descenso de la temperatura, los tubos de la centrífuga se mantuvieron calientes en una estufa hasta el momento de su utilización.

Después de centrifugar las disoluciones, se introdujo una jeringuilla en el tubo para retirar la fase acuosa. A la fase rica en surfactante se le añadió agua Milli-Q hasta 10 mL. De esta manera tenemos los analitos en el mismo volumen que el utilizado inicialmente. Después de agitar la disolución para homogeneizarla la inyectamos en el cromatógrafo.

Cuando lo que se pretendía era preconcentrar los analitos se procedía de igual forma, pero no se añadía agua después de separar las fases; solo se le añadió unos pocos microlitros de metanol a la fase rica en surfactante para disminuir la viscosidad de la misma antes de inyectarla en el cromatógrafo.

IV.4.6. Extracción y preconcentración de fenoles en muestras líquidas reales por *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 añadimos el volumen de metanol requerido hasta alcanzar un 2% (v/v), la disolución de surfactante y enrasamos con agua Milli-Q hasta alcanzar un volumen final de 10 mL. En algunos casos se añadió, además, 0,1 mL de ácido acético para modificar el pH. Luego se procedió como en el apartado anterior.

IV.4.7. Extracción por microondas en medio micelar

La muestra de 2 g de sedimento o suelo, previamente acondicionada, se

depositó en el vaso de extracción y se le añadió 4 mL de la disolución de surfactante. Después de cerrados, los tubos se introdujeron en el microondas y se les aplicó 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; este líquido es filtrado mediante filtros de jeringa de la marca Millipore de 0,45 µm de poro y 25 mm de diámetro antes de ser inyectado en el sistema cromatográfico.

IV.4.8. Extracción Soxhlet

La muestra de 1 g de suelo, previamente acondicionada con la mezcla de fenoles, se extrajo con 70 mL de una mezcla acetona-hexano (1:1) durante 16 horas, con una media de 6 ciclos por hora. El extracto fue llevado a sequedad utilizando un rotavapor y posteriormente se disolvió en 10 mL metanol para inyectarlo en el sistema cromatográfico.

IV.4.9. Acondicionamiento de las muestras sólidas

IV.4.9.1. Sedimentos marinos

Las muestras de sedimentos marinos, procedentes de diferentes puntos de las costas canarias, se lavaron con agua destilada para eliminar las sales y otras posibles impurezas. Posteriormente se tamizaron, recogiéndose 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. Después de tamizar el sedimento, éste se volvió a lavar con agua destilada y se introdujo en la estufa, a 100°C, el tiempo necesario para eliminar la humedad.

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 disolución que contenía la mezcla de fenoles, se agitaron y se cerraron herméticamente. Estas 2006

muestras se guardaron en la oscuridad, a temperatura ambiente, y se utilizaron después de 24 horas de acondicionamiento.

Para obtener muestras envejecidas utilizamos 20 g de sedimento. Se les añadió 25 mL de la disolución que contenía la mezcla de fenoles en metanol, se agitaron, se cerraron herméticamente los recipientes de cristal y se mantuvieron a 4°C en la oscuridad durante 3 meses. Después de este tiempo de acondicionamiento, se determinó el contenido de los analitos presentes en el sedimento. Previamente se retiró el metanol sobrenadante en el mismo.

IV.4.9.2. Muestras de suelos

Se tomaron muestras de suelos de diferentes zonas de la isla de Gran Canaria: en Tafira y San Roque, tierra procedente de jardines, y en Santa Brígida, procedente de un pinar. Las muestras de suelos se dejaron secar a temperatura ambiente antes de proceder a tamizarlas. En el tamizado se eligió una fracción de tamaño inferior a 0,30 mm. El acondicionamiento de estas muestras, independientemente del tiempo del mismo, se realizó de la misma forma que el de las muestras frescas de sedimentos marinos.

IV.4.10. Caracterización de los suelos

IV.4.10.1. 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 dicromáto 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 IV.1.

IV.4.10.2. 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 IV.1.

IV.4.10.3. Tamaño de grano (granulometría)

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

superiores a 0.3 mm se obtuvo la distribución granulométrica que se recoge en la Tabla IV.1.

Suolos	Tamaño de partícula (%)				5 4	Materia organica	
oueros	0.3 mm	0.2 mm	0.15 mm	0.1 mm	s ph	(%)	
Tafira	44.4	17.2	14.6	23.8	8.3	4.8	
San Roque	52.1	20.0	13.2	14.6	8.3	12.5	
Santa Brígida	56.5	17.8	12.8	12.8	5.9	3.9	

Tabla IV.1. Características de los suelos estudiados.

CONCLUSIONES

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

1. La metodología de extracción por *punto de nube* facilita en gran medida los procesos de extracción y preconcentración de derivados fenólicos presentes en muestras acuosas. La aplicación de esta metodología requiere de un menor número de etapas respecto a otras técnicas convencionales, con lo que se reduce el tiempo de análisis. Además, se sustituyen los disolventes orgánicos por otro tipo de extractantes, los surfactantes, con lo que se disminuye el coste y la toxicidad del proceso.

2. El tiempo y la temperatura de equilibración, la naturaleza y concentración de surfactante, así como la fuerza iónica del medio son factores con una influencia importante en el proceso de extracción por *punto de nube.* A fin de conseguir resultados satisfactorios dichos factores han de ser optimizados para cada surfactante.

3. La utilización del cloruro de sodio, en concentraciones superiores al 3% (m/v), mejora el proceso de extracción de los analitos y facilita la separación, y posterior manipulación, de la fase rica en surfactante. Además, al añadir esta sal a la disolución se consigue disminuir la temperatura a la que se produce el fenómeno de *punto de nube*. Este hecho tiene especial interés en el caso del POLE, ya que su temperatura crítica es muy alta.

4. Los valores de recuperación obtenidos para los distintos analitos con cada uno de los surfactantes estudiados son bastante satisfactorios, observándose que los menos polares son los que proporcionan mejores porcentajes de extracción y mayores factores de preconcentración.

5. Los resultados obtenidos al aplicar la metodología desarrollada a muestras reales, agua de mar y agua depurada, previamente acondicionadas con la mezcla de derivados fenólicos, indican que la misma no se ve influenciada por las características fisicoquímicas de la matriz.

6. La aplicación de la metodología de extracción *por punto de nube* a muestras reales de agua de mar y agua depurada presenta resultados similares a otras metodologías convencionales, como por ejemplo, la extracción líquido-líquido. Es por tanto que la extracción por *punto de nube* puede considerarse como una metodología alternativa a las ya existentes para la extracción y preconcentración de derivados fenólicos en muestras acuosas.

7. Se desarrolla un método de extracción de fenoles contenidos en muestras sólidas, basado en combinar el poder de solubilización de los surfactantes y la acción de la radiación de microondas en un recipiente cerrado. Para cada surfactante se optimizaron los parámetros de los que depende el proceso, es decir, la concentración y el volumen de surfactante y las condiciones de irradiación del microondas, tiempo y potencia. Además, se investigó la influencia del pH de la disolución extractante en la eficiencia de la extracción. La optimización de la potencia y el tiempo de irradiación del microondas se llevó a cabo utilizando un diseño factorial.

8. Los valores obtenidos en la etapa previa de optimización de condiciones muestran que el volumen de la disolución de surfactante debe ser suficiente como para que toda la muestra quede humedecida por el mismo. En la extracción de derivados fenólicos en muestras de sedimentos marinos, 4 mL son suficientes para 2 gramos de muestra. Sin embargo, en muestras de suelos, el volumen ha de ser mayor, 8 mL, puesto que la textura de este tipo de matriz es muy

diferente. Aumentar el volumen de la disolución de surfactante, por encima de los valores indicados, no mejora la eficiencia de la extracción, pero sí supone un aumento de la temperatura en el interior de los vasos del microondas, con lo que se pueden producir datos erróneos por degradación de los compuestos o por pérdidas de los mismos debido a su volatilización.

9. En el caso de la extracción de derivados fenólicos en muestras de suelos es necesario tener en cuenta las características de la matriz, fundamentalmente el pH, el contenido en materia orgánica y la textura de la misma. Dentro de los valores elegidos para nuestro estudio, la granulometría de la matriz se mostró como el factor que más influencia tenía sobre el proceso de extracción.

10. La estructura química de los analitos determina su grado de adsorción sobre las partículas de los sedimentos o suelos, y, por tanto, determina la mayor o menor facilidad con la que pueden extraerse de los mismos. De los derivados fenólicos estudiados, los alquilfenoles son los que presentan una mayor dificultad para ser extraídos. Sin embargo, cuando en una molécula están presentes, además de los grupos metilo, átomos de cloro o grupos nitro, dichas moléculas se comportan más como clorofenoles o nitrofenoles, por lo que no presentan dificultad para ser extraídas de la matriz.

11. Los resultados obtenidos en la extracción de fenoles en muestras de sedimentos marinos son bastante satisfactorios con los cuatro surfactantes utilizados, si bien, el Genapol X-080 presenta valores más bajos que los otros surfactantes. En muestras de suelos, los porcentajes de extracción de los derivados fenólicos son ligeramente más bajos que los obtenidos con los sedimentos marinos, excepto en el caso del POLE. Por esta razón, este surfactante se eligió para las aplicaciones analíticas.

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA

ANEXO I

1. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE FENOLES

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

Como en otras técnicas de análisis, es necesario realizar el estudio que permite optimizar los parámetros de los que depende. En primer lugar, hay que establecer las longitudes de onda de detección más adecuadas para cada analito, para posteriormente elegir la composición de la fase móvil que permita una adecuada resolución entre los picos de los diferentes compuestos presentes en la mezcla.

Por otra parte, el tiempo de análisis para la determinación de los compuestos ha de ser el menor posible, por lo que debemos buscar aquellas condiciones que permitan una adecuada resolución cromatográfica en un intervalo óptimo de tiempo. Para optimizar este parámetro hay que tener en cuenta que trabajar en gradiente nos permite acortar el tiempo de análisis, ya que la composición de la fase móvil puede acelerar la elución de algunos analitos. La modificación del pH de la fase móvil puede ser necesaria en algunos casos, bien para acelerar la elución de los compuestos, bien para retrasarla.

En nuestro estudio utilizamos inicialmente una fase móvil constituida por metanol:agua (80:20) y un flujo de 1 mL.min⁻¹. La proporción de los dos componentes se fue variando hasta conseguir la separación de los quince analitos presentes en la mezcla. Finalmente se estableció como más adecuada una fase móvil de agua:metanol (70:30) en régimen isocrático durante 16 minutos y un gradiente de 24 minutos para alcanzar un 100 % de metanol. Además, fue necesario añadir ácido acético (1%) al agua para reducir el pH de la fase móvil y evitar la elución de los derivados nitrogenados con el frente.

La Figura A.1 muestra un cromatograma representativo en el que, además de poner de manifiesto que se alcanzan separaciones satisfactorias, se consigue un tiempo razonable de análisis para la mezcla más compleja.

Para la determinación de la mezcla de clorofenoles se procedió de idéntica forma. En este caso, la mejor resolución se obtiene con un gradiente de 20 minutos, con una fase móvil inicial constituida por agua:metanol (60:40), para finalizar con un 100% de metanol. También añadimos ácido acético para evitar que el PCP interfiriera con otros compuestos. El cromatograma obtenido se muestra en la Figura A.2.



Figura A.1. Cromatograma de la mezcla de los quince derivados fenólicos.



.

Figura A.2. Cromatograma de la mezcla de clorofenoles.

Los tiempos de retención característicos de los diferentes compuestos estudiados se obtuvieron inyectando varias réplicas (n = 5) y calculando la media de los tiempos obtenidos para cada uno de ellos en las condiciones óptimas de análisis previamente establecidas. En la Tabla A.1 se muestran los tiempos de retención de cada analito en las dos fases móviles utilizadas para determinación de fenoles así como las longitudes de onda utilizadas para su determinación. La variación de estos tiempos, en función del medio micelar utilizado, no es significativa.

NI ⁰	Apolito	Longitud de onda	Tiempos de retención (min)		
N 	Anaiito	(nm)	Fase móvil 1	Fase móvil 2	
1	РН	270	5.3	3.5	
2	4-NP	315	8.7	-	
3	2,4-DNP	270	10.3	-	
4	PC	280	11.9	-	
5	2-NP	280	12.9	-	
6	2CP	280	14.0	6.2	
7	4CP	280	19.5	7.5	
8	2,4-DMP	280	24.7	-	
9	4,6-DNOC	270	25.3	-	
10	4-CMC	280	28.1	9.9	
11	2,4,6-TMP	280	29.1	-	
12	2,4-DCP	290	29.4	10.8	
13	4-C-3,5-DMP	280	31.4	12.1	
14	2,4,6-TCP	290	33.0	13.5	
15	PCP	300	38.2	18.2	

 Tabla A.1.
 Longitudes de onda y tiempos de retención de los diferentes derivados fenólicos.

1.1. Curvas de calibrado

La absorbancia que presentan los analitos varía ligeramente de un medio micelar a otro por lo que es necesario establecer una curva de calibrado para cada analito en los diferentes surfactantes utilizados. Para ello, se construyen gráficas de calibración en las que se representa el área del pico frente a la concentración de cada uno de los fenoles en estudio.

El intervalo de concentración elegido para realizar las curvas de calibrado fue de 50 a 1000 µg.L⁻¹, tanto para muestras líquidas en el estudio de extracción y preconcentración de fenoles mediante la metodología de *punto de nube*, como en

la extracción de fenoles de sedimentos marinos, mediante la técnica de extracción asistida por microondas. Los parámetros obtenidos para dichas curvas de calibrado se muestran en la Tabla A.2. Para la extracción de clorofenoles en muestras de suelos se utilizaron curvas de calibrado con intervalos de concentración de 100 a 1500 µg.L⁻¹, Tabla A.3. En la Tabla A.4 se muestran, asimismo, las curvas de calibrado para los 15 derivados fenólicos que se utilizaron para su cuantificación en muestras de suelo utilizando el POLE como surfactante. En este caso el intervalo de concentraciones utilizó tanto en muestras frescas como en muestras envejecidas. Los coeficientes de correlación obtenidos en todos los casos fueron superiores a 0.995, por lo que se han omitido en las tablas.

Compuesto	Genapo	080-X IO	POLE	(C ₁₂ E ₁₀)	Polidoca	nol (C ₁₂ E ₉)	C	12E6
Compuesto	Aª	B ^b	Α	В	А	В	Α	В
PH	15.30	27.4	42.60	484.4	42.20	-261.8	19.00	-67.1
4-NP	82.90	867.5	95.80	4370.9	98.20	-633.3	92.70	-905.2
2,4-DNP	67.90	116.9	72.60	620.4	76.10	-1390.3	57.60	-521.0
PC	17.20	363.8	14.20	-398.9	19.10	-911.3	17.50	-404.6
2-NP	49.90	39.8	62.30	343.2	63.70	-335.8	50.50	-818.6
2CP	19.20	193.1	22.00	-884.7	21.70	-984.1	33.60	-1212.0
4CP	0.00	0.0	14.60	-146.9	12.90	797.7	12.90	-859.4
2,4-DMP	17.20	574.2	18.30	-218.4	19.00	-667.5	35.50	-699.5
4,6-DNOC	59.60	884.3	79.40	398.4	78.00	-979.1	76.60	-986.7
4-CMC	15.30	27.4	42.60	484.4	42.20	-261.8	19.00	-67.1
2,4,6-TMP	82.90	868.0	95.80	4371	98.20	-633.3	92.70	-905.2
2,4-DCP	67.90	117.0	72.60	620.4	76.10	-1390.0	57.60	-521.0
4-C-3,5-DMP	17.20	364.0	14.20	-398.9	19.10	-911.3	17.50	-404.6
2,4,6-TCP	49.90	39.8	62.30	343.2	63.70	-335.8	50.50	-818.6
PCP	19.20	193.0	22.00	-884.7	21.70	-984.1	33.60	-1212.0

Tabla A.2. Parámetros característicos de las curvas de calibrado obtenidas para la determinación de la mezcla de quince fenoles en los diferentes medios micelares para muestras líquidas (CPE).

^aPendiente: ^bOrdenada en el origen.

Compuesto	Genapol X-080		POLE (C ₁₂ E ₁₀)		Polidocanol (C ₁₂ E ₉)		C ₁₂ E ₆	
	A ^a	BÞ	Α	В	Α	В	A	В
PH	28.16	-850.1	42.57	43.2	23.42	-887.9	29.70	-470.8
2CP	35.54	-751.1	74.76	-258.6	42.55	-1461.4	37.80	-260.0
4CP	16.89	-539.9	34.00	-361.5	18.13	-856.4	18.60	-944.8
4-CMC	17.65	-500.5	29.57	-2.0	16.62	-952.2	16.70	626.8
2.4-DCP	17.50	-1012.7	34.36	-580.0	19.27	-783.5	18.20	-651.1
4-C-3.5-DMP	12.82	-348.1	24.31	-332.0	12.65	-318.5	13.70	456.8
2.4.6-TCP	15.33	418.0	28.13	3350.2	17.38	-482.6	16.24	385.2
PCP	15.31	-167.4	26.11	-35.3	12.68	-887.9	14.25	1086.2

Tabla A.3 Parámetros característicos de las curvas de calibrado obtenidas para la determinación de la mezcla de clorofenoles en los diferentes medios micelares para muestras sólidas (MAME).

^a Pendiente; ^b Ordenada en el origen.

© Del

Compuesto	Aª	B°
PH	31.81	-3765.7
4-NP	101.79	-5834.2
2.4-DNP	88.76	-8331.9
PC	23.61	-2715.2
2-NP	65.20	-3542.9
2CP	47.18	-6733.1
4CP	15.49	-2131.6
2.4-DMP	64.19	-3395.9
4.6-DNOC	93.10	-7788.9
4-CMC	19.77	-1510.0
2.4.6-TMP	14.72	-779.4
2.4-DCP	16.17	-930.4
4-C-3.5-DMP	13.86	-571.0
2.4.6-TCP	18.78	-1678.6
PCP	14.49	1237.8

 Tabla A.4.
 Parámetros característicos de las curvas de calibrado para la determinación de fenoles en muestras de suelo utilizando POLE como extractante.

^a Pendiente; ^b Ordenada en el origen.

ANEXO 2

PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES



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

Publicaciones

• Use of non-ionic surfactant solutions for the extraction and preconcentration of phenolic compounds in water prior to their HPLC-UV detection.

C. Mahugo Santana, Z. Sosa Ferrera y J.J Santana Rodríguez The Analyst 127 (2002) 1031

• Extraction and determination of phenolic derivatives in water samples by using polyoxyethylene surfactants and liquid chromatography with photodiode array detection.

C. Mahugo Santana, Z. Sosa Ferrera y J.J Santana Rodríguez

J. AOAC International 87 (2004) 166

• Use of polyoxyethylene 6 lauryl ether and microwave-assisted extraction to the determination of chlorophenols in marine sediments.

C. Mahugo Santana, Z. Sosa Ferrera y J.J Santana Rodríguez Analytica Chimica Acta, en prensa (2004)

• Determination of phenols in marine sediments by using microwave assisted micellar extraction and liquid chromatography.

C. Mahugo Santana, Z. Sosa Ferrera y J.J Santana Rodríguez

J. Chromatography Science, enviado para su consideración (2004)

• An environmentally friendly method for the extraction and determination of priority phenols in soils using microwave assisted micellar extraction.

C. Mahugo Santana, Z. Sosa Ferrera y J.J Santana Rodríguez Analytical Chemistry, enviado para su consideración (2004)

Comunicaciones

• Determinación de compuestos fenolicos en agua usando un surfactante no iónico para su extracción y preconcentación previo a su detección mediante HPLC-UV.

C.Mahugo Santana, Z.Sosa Ferrera, J.J.Santana Rodríguez XII Reunión Científica de la Sociedad Española de Química Analítica Huelva (España) Septiembre 2001

• Comparative study of the extraction and preconcentration of phenolic compounds in water using two non-ionic surfactants prior to their HPLC-UV detection.

C. Mahugo Santana, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodríguez

VII International Symposium on Analytical Methodology in the Environmental Field

Valladolid (España) Marzo 2002

• Application of microwave-assisted extraction using micellar media to the determination of phenols in marine sediments.

C. Mahugo Santana, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodríguez

10ª Jornadas de Analisis Instrumental

Barcelona (España) Noviembre 2002

• Use of polyoxyethylene 6 lauryl ether and microwave-assisted extraction to the determination of chlorophenols in marine sediments

C. Mahugo, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodríguez

XIII Reunión de la Sociedad Española de Química Analitica.

VIII International Symposium on Analytical Methodology in the Environmental Field A Coruña (España) Octubre 2003

• Use of polyoxyethylene 10 lauryl ether on the extraction and determination of phenolic compounds in marine sediments.

C. Mahugo, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodríguez 4th European Meeting on Environmental Chemistry Plymouth (Inglaterra) Diciembre 2003

• Determination of priority phenols in marine sediments after microwave assisted micellar extraction.

C. Mahugo, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodríguez XII EUROANALYSIS Salamanca (España) Septiembre 2004

USE OF NON-IONIC SURFACTANT SOLUTIONS FOR THE EXTRACTION AND PRECONCENTRATION OF PHENOLIC COMPOUNDS IN WATER PRIOR TO THEIR HPLC-UV DETECTION

C. MAHUGO SANTANA, Z. SOSA FERRERA Y J.J SANTANA RODRÍGUEZ THE ANALYST 127 (2002) 1031

Use of non-ionic surfactant solutions for the extraction and preconcentration of phenolic compounds in water prior to their HPLC-UV detection

-	FULL PAPER ANALYST
l	www.rsc.org/analyst

C. Mahugo Santana, Z. Sosa Ferrera and J. J. Santana Rodríguez*

Department of Chemistry, Faculty of Marine Sciences, University of Las Palmas de Gran Canaria, 35017 Las Palmas de Gran Canaria, Spain. E-mail: josejuan.santana@quimica.ulpgc.es; Fax: + 34928452922; Tel: + 34928452915

Received 27th February 2002, Accepted 23rd May 2002 First published as an Advance Article on the web 11th July 2002

A simple and rapid HPLC method with spectrophotometric detection to determine phenolic compounds in water, including the 11 priority phenolic pollutants, is described. As they are present in low concentrations, an extraction and preconcentration step is necessary prior to their determination. A methodology based on the cloud point phenomenon is applied using the non-ionic surfactant oligoethylene glycol monoalkyl ether (Genapol X-080) as extractant. The optimum conditions for the extraction and preconcentration of phenolic derivatives have been established and detection limits lower than 10 μ g L⁻¹ were obtained for all studied compounds. The method has been applied to their determination in sea water and depurated waste water samples.

Introduction

Phenol and its derivatives are widely used in the chemical industry and in agriculture as herbicides, insecticides and fungicides.^{1,2} However, phenolic compounds are not only generated by human activity, they are also formed naturally as a result of some types of vegetable decomposition.

Phenols, especially chlorophenols, have a highly toxic character and it is well known that these substances exhibit properies that are hazardous to human health.³ Owing to their toxicity and presence in the environment, 11 phenols have been included in the priority pollutant list of the United States Environmental Protection Agency (USEPA).⁴

The interest in determining phenolic compounds in water has increased in recent years, not only as a result of their toxicity to fish and aquatic life in general, but also due to their affecting the taste and odour of water at non-toxic concentrations.⁵

There are various methods that can be used to determine phenols in water and these include gas⁶ and liquid chromatography.⁷⁻¹⁰ However, these compounds are present in the environment in low concentrations and an enrichment step therefore needs to be carried out prior to separation and detection. Commonly used methods for sample preconcentration are liquid-liquid and solid-phase extraction.¹¹⁻¹³

These methods have several disadvantages. Standard and official methods for determining phenols in water still used liquid-liquid extraction (LLE) as a preconcentration step.¹⁴⁻¹⁶ The major disadvantages of LLE are the use of large volumes of high purity organic solvents, with the high costs that this involves and their toxicity. Moreover, other drawbacks include the length of the analysis time and the difficulties regarding automating the procedures. The recoveries of this method are generally acceptable and vary from one component to another and are lower for the more volatile ones. A further serious limitation is the problems associated with the formation of emulsion or foam when surface or waste waters are extracted.

Nevertheless, there is an increasing tendency to replace LLE by solid-phase extraction (SPE) and solid-phase microextraction (SPME). SPE is based on differential migration processes, during which compounds are adsorbed and eluted as they are swept through a porous medium by a mobile phase flow, which is dependent on the differential affinities between the sorbent

DOI: 10.1039/b202092k

material and the mobile phase. Several sorbents have been tested for determining pesticides and phenolic compounds.¹⁷

The most frequently used design for SPE is the cartridge, although the disk has grown in popularity over recent years. Cartridge designs have certain disadvantages for water analysis: the cross-sectional area is small; sample processing rates are slow, the tolerance to blockage by particles and adsorbed matrix components is low, and channelling reduces the capacity to retain analytes. Some of these problems may be solved by using disks.¹⁸

Another determining factor in the choice of the solid phase is the volume of the sample to be analysed. The volume of analyte solution that can flow through the cartridge before breakthrough occurs is the 'breakthrough volume' and is used as a measure of the extraction capacity of the solid sorbent. One of the drawbacks of using disks instead of cartridges is the decrease in the breakthrough volume, mainly in the case of more polar compounds. The high variability of breakthrough volumes for phenols, which is mainly dependent on the polarity of the compounds.

Another drawback in SPE, which is the same for LLE, is the considerable amount of time needed and manual operations involved. Sample throughput is low and the economic expense is high. Laborious operations such as conditioning, washing, elution and solvent evaporation are needed. In addition, clotting, channelling and percolation are typical problems of SPE encountered in everyday laboratory work.

The main problem encountered with SPE is the lack of selective sorbents when analyzing tap, surface and river water. Many published results on SPE of phenols corresponded to model or synthetic water samples, so matrix effects were not sufficiently addressed. There are two main drawbacks associated with SPE of phenol compounds from large volumes of real water samples. First, a decrease in recovery and breakthrough volume values, in comparison with the results obtained for artificial samples. This diminution is related to the presence of other species which can saturate the load capacity of the sorbent. Fulvic and humic acids are normally responsible for this behaviour. Secondly, when UV or electrochemical detec-

Analyst, 2002, 127, 1031-1037 1031

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2002

tion is used, these acids result in a broad band being observed at the beginning of the chromatograms. This band can affect the most polar compounds, eluted with relatively low retention times, which prevents them from being determined.¹⁹

Other methodologies have been developed with a view to eliminating or, at least, minimizing the use of organic solvents and simplifying the operating procedure. The use of preconcentration steps based on phase separation by the cloud point methodology offers a convenient alternative to more conventional extraction systems. Aqueous solutions of some surfactants have been used in cloud point extraction (CPE) of different species, prior to their determination using several techniques.²⁰⁻³⁰ From the analytical point of view, one of the most important properties of these organized structures is their good capacity to solubilize solutes of different types and nature. The small volume of the surfactant-rich phase allows us to preconcentrate and extract the analytes in one step, prior to gas or liquid chromatographic analysis. Moreover, this methodology has the advantages of safety, low cost and no toxicological effects due to their biodegradability.

In this paper, we describe the results of a study of the experimental parameters which affect the extraction efficiency and preconcentration factor of the CPE process of a series of phenolic compounds, prior to determining them by means of high-performance liquid chromatography (HPLC), using the non-ionic surfactant oligoethylene glycol monoalkyl ether (Gerapol X-080). This CPE methodology has been applied to the analysis of a mixture of 14 phenolic derivatives in sea water and depurated waste water samples.

Experimental

Reagents

Stock solutions of the phenolic compounds were obtained from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) and prepared by dissolving appropriate amounts of the computerial products in methanol. They are listed in Table I. Numbers identify the compounds in the tables and figures. The standard certified mixture of phenolic compounds no. X 190103 was obtained from the Laboratories Dr. Ehrenstorfer GmbH (Germany) (provided by Imatra, Barcelona, Spain).

The surfactant oligoethylene glycol monoalkyl ether, Genapol X-080, was obtained from Sigma-Aldrich and prepared in de-ionized water. Methanol HPLC-grade and NaCl were obtained from Parreac Química S.A. (Barcelona, Spain).

All solvents and analytes were filtered through a 0.45 µm nylon membrane filter and ultra-high-quality water obtained from a water purification system was used throughout.

Table 1 List of	phenolic derivatives, retention times and wavelengths
-----------------	---

No	Comprand	Abbreviation	te/min	λ/nm
1	Phenol	PH	5.3	270
2	4 Nitrophenol	4 NP	8.7	313
3	2.4-Dinitrophepol	2,4-DNP	10.3	260
4	para-Creso)	PC	11.9	279
5	2-Nitronbenol	2-NP	12.9	279
6	2-Chlorophenol	2-CP	14.0	275
7	2.4-Dimethylphenol	2.4-DMP	24.7	280
8	4.6-Dinitro-ortho-cresol	4.6-DNOC	25.3	280
9	4-Chloro-meta-cresol	4-CMC	28,1	280
10	2.4.6 Trimethylohenol	2.4.6 TMP	29.1	280
ii –	2.4 Dichlorophenol	2.4-DCP	29.4	280
12	4-Chloro-3.5-dimethylphcool	4-C-3.5-DMP	31.4	280
13	2.4.6-Trichlarophenal	2.4.6-TCP	33.0	290
14	Pentachlorophenol	PCP	38.2	303

1032 Analyst, 2002, 127, 1031-1037

Apparatus

The chromatographic system consisted of two Waters 510 pumps fitted with a Waters injector model Rheodyne 7725 with a 20 µL sample loop and a Waters 996 photodiode array detector. The system and the data management were controlled by Millenium software from Waters (Waters Chromatografia S.A. Barcelona, Spain). The stationary-phase column was a Waters Nova-Pack C₁₈, 3.9 × 150 mm id 4 µm particle diameter. The analytical column and the mobile phase reservoir were water-jacketed and thermostated at 25 ± 1 °C with a circulating bath.

A thermostated bath (Tectron 200) and a centrifuge (Mixtasel), from Selecta (Barcelona, Spain), were also used.

Procedures

Cloud point determination. The cloud point of different Genapol X-080 solutions was determined by observing the appearance of the two phases when the aqueous solutions of surfactant in a 0.1-7.5% v/v and NaCl 5% m/v concentration range were heated in the thermostated bath. The temperature was increased by 5 °C every 10 min until turbidity and the consequent phase separation was observed. In order to avoid the evaporation of the solvent, this study was carried out using 10 mL calibrated, hermetically sealed test-tubes.

Ratio of phases. The ratio between the volume of the aqueous phase (V_{w}) and the volume of surfactant-rich phase (V_{o}). (V_{a}/V_{o}), was measured in tubes calibrated for solutions with different amounts of surfactant and NaCl 5% m/v, under the same experimental conditions as those used for the phase separation (healing at 85 °C and centrifuging at 3500 rpm for 5 min).

Extraction and preconcentration. Aliquots of 10 mL, with the analytes in the presence of surfactant and NaCl aqueous solution were kept in a controlled temperature bath for 20 min at 85 °C. The pH was adjusted by adding 1% acetic acid. Separation of the two phases was achieved by centrifuging for 5 min at 3500 rpm.

To determine the percentage extraction, after phase separation, 0.5 mL of methanol and water were added to the surfactant-rich phase up to initial volume, and 20 μ L of this solution was injected into the LC system.

To obtain the preconcentration, after phase separation, the surfactant-rich phase was diluted with methanol (0.25 mL) to reduce its viscosity, and water until a final volume of 2 mL was reached. Under these conditions, a preconcentration factor of 5 was obtained. Following this, 20 µL of this solution was injected. To obtain a preconcentration factor of 10, 20 µL of the surfactant-rich phase, without dilution, was injected directly into HPLC system, after surfactant phase separation In all cases, the values reported are the average of duplicate determinations.

Liquid chromatography analysis with UV detection. The chromatographic conditions were established in a water (containing 1% acetic acid) : methanol, mobile phase with a gradient elution 70 : 30 in 16 min (isocratic), up to 100% methanol in 24 min. The flow rate was 1 mL min⁻¹, which allowed an efficient separation of the phenolic compounds studied.

The separation and determination of the compounds under study were performed by directly injecting 20 μ L of solution into the liquid chromatograph and the absorbance for each analyte, corresponding to the wavelength maxima, was measured. The retention time and the wavelength for each compound are listed in Table 1. The range of calibration curve concentration was between 20 and 400 μ g L⁻¹.

Determination of phenolic compounds in water samples. Prior to the analysis, sea water and depurated waste water were successively passed through filters with different porosity (0.45 and 0.22 μ m) and UV radiation to avoid the possible interference of micro-organisms.

Solutions of 10 mL containing 4 mL of sea water or depurated waste water were spiked with suitable amounts of phenolic derivatives and analysed according to the established CPE method. The values reported are the average of triplicate determinations.

Results and discussion

Phase diagram

When non-ionic surfactant solutions are heated above cloud point temperature, the micellar solution separates into two phases. The phase diagram (coexistence curve) for the surfactant Genapol X-080 and 5% m/v NaCl can be seen in Fig. 1 (L means single isotropic solution and 2L indicates that two isotropic phases coexist). This curve shows the cloud point values at different surfactant concentrations. It may be seen that the temperature of the cloud point remains almost constant and geual to 65 °C for surfactant concentration values ranging between 1% and 7.5% v/v. The cloud point temperature obtained when NaCl is added in a 5% v/v concentration, is less than the temperature obtained when working without this salt.³¹

Phase volume ratio

The volume of surfactant-rich phase depends on the surfactant volume and concentration,^{22,33} among others factors. The effect of these factors upon the phase ratio was evaluated. These parameters were studied by first keeping the volume of surfactant added constant, but modifying the final concentration in solution, and then by varying the added volume of surfactant in solution with a final constant concentration.



Fig. 1 Phase diagram for Genapol X-080 in NaCl 5% w/v. The region above the consolution curve is a two phase region (2L).

Table 2 shows the variation of volume ratio as the concentration of Genapol X-080 is increased. The variation is more significant when the concentration is in the range 0.5-1% v/v, as the ratio decreases more slowly using this concentration. Although greater preconcentration factors could be obtained if the surfactant concentration were decreased, the volume of the surfactant-rich phase would be too small to measure and work with and the accuracy and reproducibility would probably suffer. A 3% v/v concentration was chosen in order to establish an adequate relation between the concentration of surfactant in solution and volume of extracted surfactant-rich phase. With these conditions, we obtain a surfactant-rich phase volume of 1 mL, which leads to a preconcentration factor of 10. However, in order to reduce the viscosity of the surfactant-rich phase and facilitate its manipulation, 250 µL of methanol and water were added, until a final volume of 2 mL was reached and a preconcentration factor of five times was obtained.

In order to check the influence of the volume of surfactant added, with the concentration being kept constant, the surfactant volume was varied between 1 and 8 mL, and it was seen that changes in the volume of surfactant added did not have any significant effects on the volume ratio. This remains almost constant in the range of volumesstudied, and a volume of 3 mL has therefore been chosen for subsequent studies.

It had been reported that the volume of the surfactant-rich phase might decrease when the cloud point temperature and the phase equilibration time are increased.³⁴ However, the equilibration time in this study was varied from 10 to 30 min and the temperature was changed between 80 and 100 °C with no appreciable effects on phase ratio.

Optimization of the extraction of phenolic compounds

The extraction process can be altered by different factors such as equilibration time, pH, concentration of surfactant and addition of salt.³⁵ The effect of these factors on the percentage extraction of studied analytes therefore needs to be established.

Effect of the equilibration time and pH. The recovery percentage depends on the time that the analytes have to interact with the micelles and get into their core. ³⁶ The equilibration time at a temperature close to the cloud point temperature for the analytes under study therefore needs to be considered in order to optimize the extraction process.

It had been reported that longer equilibration times (more than 30 min) do not have any significant effect on the extraction parameters and that an equilibration time of 20 min is sufficient to obtain a good extraction.³⁶

Fig. 2 shows the dependence of the percentage extraction of phenolic compounds on the equilibration time. In the case of more polar compounds, such asphenol, 2-CP or 2,4-DNP, the fraction of solutes in the surfactant-rich phase increases to a maximum value (20 min) and then decreases as the equilibration time is increased. After 25 min of equilibration time, the percentage of solutes extracted only increases slightly. However, for most hydrophobic solutes, such 2,4-DCP, 2,4,6-TCP

Table 2 Influence of the different concentrations of Genapol X-080 in the volume ratio

Genapol X-080 (% v/v)	Vw/mL	Vs/mL	V _w /V _S	
 0.5	9.8	0.2	49.0	
1.0	9.6	0.4	24.0	
3.0	9.4	0.6	15.7	
5.0	9.2	0.8	11.5	
7.5	8.6	1.4	6.1	

Analyst, 2002, 127, 1031-1037 1033

and PCP, the percentage extraction is essentially the same in the time range studied. An equilibration time of 20 min was chosen as being the most appropriate for subsequent studies.

The ionic form of a neutral molecule normally does not interact with the micellar aggregate as strongly as its neutral form does and a lesser amount of the analyte is therefore extracted.²⁵ This was studied at two pHs in order to determine the effect of pH on the percentage extraction. Firstly, the solutes were extracted without any pH modification (this pH corresponds to the pH of the final solution once the surfactant had been added) and secondly, the pH was modified by adding 1% acetic acid to the solution so that the solutes were in their nonionized form. When working with pH modification, the percentage extraction is better for most solutes and is the most noticeable change for more polar compounds. For example, the percentage of 2,4-DNP extracted increases from 21 to 49% when modifying the pH, while the recovery obtained for 2,4,6-TCP or PCP was almost the same.

Effect of the concentration of surfactant. This study was carried out by varying the concentration of Genapol X-080 between 0.5 and 7.5% v/v. Fig 3 shows the effect of increasing the concentration of surfactant on the percentage extraction of surfactant increases, although the changes are not the same for all compounds. In the case of the most polar analytes, such as phenol or 4-NP, this increase is greater when the concentration is inweased from 0.5 to 3% v/v. Then, the fraction of analytes extracted increases, slightly more between 3 and 7.5% v/v. The most hydrophobic compounds, such as 2,4,6-TCP and PCP, with higher recoveries, show a slight increase up to 3% v/v and the recoveries remain constant over this concentration value.

It is possible to achieve almost complete extraction of the analytes when working with a concentration of Genapol X-080 above 7% v/v, but the preconcentration factor would be too small as the surfactant-rich plase volume increase. Furthermore, a concentration of surfactant over 3% v/v leads to a loss of efficiency in the chromatographic separation of some of these compounds. Under these conditions a surfactant-rich phase volume of approximately 1 mL is obtained, which means these is a preconcentration factor of 10. However, this results in an overlap of the peaks of some components, especially in the cases of PC, 2,4-DMP and 2,4,6 TMC. This situation may be due to the high viscosity and density of the surfactant-rich phase



Fig. 2 Influence of the equilibration time on the recovery of phenolic derivatives. For an explanation of the numbering refer to Table 1.

1034 Analyst, 2002, 127, 1031-1037

which leads to the chromatographic peaks of these phenols being overlapped partially (or appearing very close). The addition of up to 2 mL of methanol and water to the surfactantrich phase, in order to reduce its viscosity, allows all the components of the mixture to be satisfactorily separated, with a preconcentration factor of 5.

Higher preconcentration factors could be obtained if the surfactant concentration decreases, but working with smaller surfactant-rich phase volumes makes the handling of the sample more difficult and the exactness and reproducibility of the method decrease. Finally, a 3% v/v surfactant concentration was chosen because it allows high recoveries of most analytes and a good separation.

Effect of the ionic strength. The study of the influence of this parameter was carried out by adding different percentages of NaCl. The addition of an inert salt can facilitate the phase separation process for some non-ionic surfactants system, as it increases the density of the bulk aqueous phase.20The two phases formed after the cloud point extraction with Genapol X-080 are of very similar densities and co-mingled almost immediately after the centrifugation step. The use of NaCl facilitates the separation of the surfactant-rich phase from the aqueous phase. When the salt concentration is increased, the micelle size and the aggregation number are increased and the critical micellar concentration remains constant.21 In addition, non-polar analytes may become less soluble in the solution at higher salt concentrations and thus contribute to higher recoveries. The results obtained indicate that the addition of salt produces an increase in the extraction of the more polar solutes while the recoveries of the less polar compounds are not affected. Fig 4 shows the variation of the extraction percentages for some phenolic compounds when the salt concentration is increased. For example, a 20% increase in the recovery of 4-NP, 2-NP and 2-CP was obtained as the concentration of NaCl was increased from 1 to 7.5%. A concentration of 6% m/v was chosen for subsequent studies.

HPLC analysis

Another important step in this study is the optimization of the chromatographic conditions for the separation and determination of the 14 phenolic derivatives. An eluent mixture



Fig. 3 Influence of the final concentration of surfacent on the recovery percentages of some phenolic compounds. For an explanation of the numbering refer to Table 1. containing 70% water (with 1% acctic acid) and 30% methanol was used to achieve the separation of the first six phenols. After 16 min, most hydrophobic phenols were eluted by a step gradient up to 100% methanol in 24 min. The chromatogram obtained for the mixture of phenols is shown in Fig. 5. It can be observed that this mobile phase allows a good separation of analytes and a short analysis time.

The corresponding calibration curves for each analyte were obtained by duplicate injection of the sample containing 3% v/v Genapol X-080, 5% v/v methanol and the corresponding analyte concentration. Concentrations ranged between 20 and 400 µg L⁻¹. A linear relationship was obtained between the peak areas and the analyte concentrations, with a high correlation coefficient (0.999). Table 3 shows the parameters of the regression equations of the calibration curves, together with the relative standard deviation (RSD) values and limits of detection (LOD). The relative standard deviation was calculated for 11 samples, to which the complete procedure (cloud point extraction, preconcentration and chromatographic separation) was applied for all compounds studied and a standard deviation value range of between 3.78 and 7.14% was obtained. The detection limits³⁷ were calculated as twice the noise for each



Fig. 4 Influence of ionic strength on the recovery percentages. For an explanation of the numbering refer to Table 1.



Fig. 5 Eution of a mixture of 14 phenotic derivatives, containing 1 mg L^{-1} of each phenol. Chromatographic conditions as described in the text. For an explanation of the numbering refer to Table 1.

phenolic compound in Genapol X-080 and NaCl, using CPE methodology. The detection limits varied between 2 and 10 µg L⁻¹ for all compounds studied when the preconcentration factor was 5 and were between 1 and 5 µg L⁻¹ when the presumcentration factor was 10. For PC, 2,4-DMP and 2,4,6 TMC the detection limits can not be determined in under these conditions according to the previous explanation.

A standard certified mixture of 11 phenols was prepared in 10 mL of a 3% v/v equeous solution of Genapol X-080 and 5% m/v NaCl and the complete extraction procedure was applied to test the validity of the proposed method. After the CPE step, 20 µL of the extracted surfactant-rich phase were injected directly into the chromatographic system. Fig 6 shows the chromatogram obtained. In general, the data listed in Table 4 show highly satisfactory recovery percentages for the phenols determined.

Analytical applications

Once the method was optimized, it was applied to the determination of phenols in two kinds of water samples, sea water from the SW area of Gran Canaria Island (Canary Islands, Spain) and depurated waste water. Both samples were previously spiked with two concentrations, at 100 and 300 gg L⁻¹,

Table 3 Analytical characteristics of the method

Compound	Slope	Салетсері	RSD= (%)	LOD#/µg L-1	LOD [.] / µg L ^{_1}
PH	15.28	27.38	5.42	4	2
4-NP	82.94	867.50	4.66	2	1
2,4-DNP	67.91	116.90	5.39	3	1.5
PC	17.20	363.76	6.40	6	<u> </u>
2-NP	49.91	39.81	4.81	3	1.5
2CP	19.17	193.07	7.14	5	2.5
2,4-DMP	17.16	574.16	5.44	6	_
4,6-DNOC	59.57	884.27	3.85	3	1.5
4-CMC	12.92	478.71	3.78	5	25
2.4.6-TMC	11.99	287.43	6.20	5	<u> </u>
2.4-DCP	12.54	426.65	5.77	5	2.5
4-C-3.5-DMP	11.29	-24.51	6.07	5	2.5
2.4.6-TCP	13.47	533.70	5.87	5	25
PCP	10.53	1042.5	4.72	10	5

 $a_{R} = 6$. Preconcentration factor of 5. Preconcentration factor of 10. a_{LOD} cannot be determined due to ovelapping of the chromatographic peaks.



Fig. 6 Elution of standard certified mixture of phenolic comprainds, containing 0.8 mg L⁻¹ of each phenol, after CPE process. Chromatographic conditions as described in the text. For an explanation of the numbering refer to Table 1.

Analyst, 2002, 127, 1031-1037 1035
of a mixture of 14 phenolic derivatives. The results shown in Table 5 indicate very satisfactory recoveries for all phenolic compounds present in the mixture.

Conclusions

The optimized method described in this work gives satisfactory results for the extraction, preconcentration and determination of phenolic derivatives. The cloud point procedure is very competitive with all conventional methods for extracting phenols. Organic solvents are required as either the extracting solvent in LLE oras eluting solvent for SPE. No volatile organic solvents are required in the cloud point procedure, which is an important advantage. Another advantage of the CPE methodology is that the wide variation of the initial analyte concentration does not appreciably alter the extraction recoveries achieved. Moreover, the CPE technique is not at all analogous to the breakthrough volume associated with the solid-phase sorbent procedures. Should the surfactant-rich phase becomes saturated, a higher concentration of surfactant in the solution may be employed. Finally, this methodology considerably reduces the time needed to prepare the sample, as it is not necessary to prepare it, and the extraction time is also lower.

Table 4 Recovery percentages of phenolic compounds in water pre-viously spilled with a standard certified mixture

Compound	Recovery [®] (%)		
	Amount edded 100 µg L ⁻¹	Amount added 300 µg L-1	
PH	70 ± 9*	70 ± 3	
4-NP	87 ± 7	83 ± 1	
2,4-DNP	89 ± 11	82 ± 6	
2-NP	80 ± 5	78 ± 6	
2 CP	75 ± 12	76 ± 7	
2,4-DMP	66 ± 6	61 ± 6	
4,6-DNOC	108 ± 6	109 ± 7	
4-CMC	100 ± 4	107 ± 4	
2,4-DCP	110±6	114 ± 6	
2,4,6-TCP	119 ± 1	121 ± 7	
PCP	102 ± 10	118±5	

Table 5 Recovery percentages of phenolic compounds in sea water and waste water previously spiked with the 14 phenolic derivatives depurated studied

	Recoverye (%)				
	Sea water		Depurated w	Depurated waste water	
Compound	100 pg L~1 added	300 µg L ⁻¹ added	100 pg L-1 added	300 pg L-1 added	
PH	69±5°	67±5	58 ± 5	61 ± 5	
4-NP	85 ± 3	82 ± 8	70 ± 3	77 ± 5	
2.4-DNP	71 ± 5	77 ± 5	66 ± 5	66±5	
PC	61 ± 10	81 ± 8	64 ± 10	63 ± 6	
2-NP	73 ± 7	76±6	65 ± 7	68 ± 5	
2CP	74 ± 7	79 ± 7	70 ± 7	70 ± 7	
2.4-DMP	87 ± 11	84 ± 5	74 ± 11	84 ± 5	
4.6-DNOC	94 ± 4	98 ± 4	82 ± 4	87 ± 4	
4-CMC	99 ± 4	109 ± 2	92 ± 4	102 ± 4	
2.4.6-TMP	74 ± 8	79 ± 6	67 ± 8	67 ± 6	
2.4-DCP	97 ± 7	106 ± 5	101 ± 7	103 ± 6	
4-C-3.5-DMP	106 ± 13	100 ± 5	104 ± 13	98 ± 6	
2.4.6-TCP	107 ± 6	111 ± 11	102 ± 6	102 ± 6	
PCP	110±5	107 ± 9	104 ± 5	103 ± 5	
" Mean of three	determination	. * Average rec	overy ± sands	ord deviation	

1036 Analyst, 2002, 127, 1031-1037

The detection limits of the method, in the 1–5 $\mu g \; L^{-1}$ range, are slightly higher than those obtained with solid-phase extraction, where enrichment makes it possible for phenols to be determined at the part-per-trillion level, but the method can be considered as an alternative in the analysis of surface waters, for which requirements are in the 1-10 µg L 1 range.38 We consider that lower detection limits may be obtained using more sensitive detectors, such as mass spectrometry coupled to liquid chromatography. Finally, the results obtained with the proposed method indicate that the CPE methodology is a good alternative extraction technique for these kinds of analytes in aqueous samples and also demonstrate the validity of the method for aqueous samples with different levels of salinity.

Acknowledgements

This work was supported by funds provided by the Autonomous Government of the Canary Islands (Spain). Research Project No. PI2000/045.

References

- T. Herberger and H. Sten, Anal. Chim. Acta, 1997, 341, 21.
- S. Lacorte and D. Barceló, Environ. Sci. Technol., 1994, 28, 1159. 3 M. Llompart, R. Lorenz and R. Cela, J. High Resolut. Chromatogr., 1996 19 207.
- J. E. Longbottom and J. J. Lichanberg, Method for Organic Chemical 4 Analysis of Municipal and Industrial Wastewater, Method 604, US EPA, 1982, EPA-600/4-82-057.
- C. P. Ong, H. K. Lee and S. F. Li. J. Chromatogr., 1989, 464, 405. 6

- EPA Method Fed. Regist., 1979, 233, No., 44), 69464. W. L. Hinze, Sep. Purif. Methods, 1981, 10, 159. E. Smolkova-Keulemansova, J. Chromologr., 1982, 251, 17. 9 O. Busto, J. C. Olucha and F. Borrull, Chromatographia, 1991, 82,
- J. Ruano, L Urbe and F. Borrull, J. Chromatogr., A, 1993, 655, 10
- 217 11 J. Cauzzwa, C. Levenberger, J. Tremp, W. Giger and M. Ahel, J. Chromalogr., 1987, 403, 233.
- 12 M. C. Hennion, C. Can-Dit-Courses and V. Pichon, J. Chromatogr., A, 1998, 823, 147.
- 13
- M. C. Hennion, J. Chromatogr., A, 1999, 856, 3. Federal Register, EPA Method 604, Phenols, Part VIII, 40 CFR Part 14 136, Environmental Protection Agency, Washington, DC, 1984, p.
- 15 EPA Method 625, BaselNeutrals and Acids, Part VIII, 40 CFR Part 136, Environmental Protection Agency, Washington, DC. 1984, p. 153
- 16 EPA Method 8041, Phenois by Gas Chromatography: Capillary Column Technique, Environmental Protection Agency, Washington, DC, 1995, p. l.
- 17 M. W. F. N elen, Selective On-Line Precolumn Sample Handling and Trace Enrichment in Liquid Chromasography, Ph. D. Thesis, Free University of Amsterdam, 1987.
- N. Masqué, R. M. Marcé and F. Borrull, Trends Anal. Chem., 1998, 18 17. 384.
- 19 I. Rodrigoez, M. P. Liompart and R. Cela, J. Chromatogr., A, 2000. 885, 291.
- 20 T. Saitoh and W. L. Hinze, Anal. Chem., 1991, 63, 2520.
- B. Froschi, G. Sungi and R. Niesman, Fresenius' J. Anal. Chem., 21 1997. 357. 743.
- 22 C. García Pinto, J. L. Pérez Pavón and B. Moreno Cordero, Anal. Chem., 1995, 67, 2605.
- 23 S. R. Sinimanne, J. R. Barr and D. G. Patterson, Anal. Chem., 1996. 68, 1556.
- A. Eiguren Fernández, Z. Sosa Ferrera and J. J. Santana Rodríguez, Anal. Chim. Acta, 1998, 358, 145. 24
- 25 A. Eiguren Fernández, Z. Sosa Ferrera and J. J. Santana Rodríguez, Analyst, 1999, 24, 487. 26
- L. Calvo Sermero, M. E. Feruández Laespada, J. L. Pérez Pavón and B. Morreno Cordero, J. Chromatogr., A, 2000, 897, 171.
 E. Pramauro, Ann. Chim. (Rome), 1990, 80, 101. 27
- 28 W. L. Hinze and E. Pramauro, Crit. Rev. Anal. Chem., 1993, 24, 133
- 29 T. Saitoh and W. L. Hinze, Talanta, 1995, 42(1), 119.

- 30 R. Carabias Martínez, F. Rodríguez Gonzalo, B. Moreno Cordero, J. R. Carabias Martínez, F. Rochfguez Genzalo, B. Moreno Cordero, J. L. Pérez Pavóo, C. Garcías Pinito and M. E. Fernández Laespada, J. Chromatogr., A. 2000, 902, 251.
 T. Gu. and P. A. Galera-Gómez, Colloids Surf., 1995, 104, 307.
 A. Eigurea Fernández, Z. Soas Ferrera and J. J. Santana Rodríguez, Quím. Anal., 1997, 16(2), 283.
 E. Pramaturo and E. Pelizzetti, Colloids Surf., 1990, 48, 193.
 W. L. Hinze, Cloud Point Extraction and Preconcentration Proce-dures for Organic and Related Polluants of State Concern. Water

Resources Research Institute of the University of North Carolina,

- Raleigh, 1992, Report 269, p. 36.
 R. P. Frankewich and W. L. Hinze, Anal. Chem., 1994, 66, 944.
 H. Tani, T. Kamidate and H. Watanabe, J. Chromatogr., A, 1997,
- 37
- Fan, T. Kamdate and H. Watanabe, J. Chromatogr., A. 1991, 780, 229.
 S. Lindsay, in High Performance Liquid Chromatography, Wiley, New York, 1992, p. 71-72.
 Off. J. Eur. Commun., 7/25/75. L194, Council Directive 75/440/EEC. 38

Analyst, 2002, 127, 1031-1037 1037

÷.

÷

USE OF POLYOXYETHYLENE 6 LAURYL ETHER AND MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION TO THE DETERMINATION OF CHLOROPHENOLS IN MARINE SEDIMENTS

C. MAHUGO SANTANA, Z. SOSA FERRERA Y J.J SANTANA RODRÍGUEZ ANALYTICA CHIMICA ACTA, EN PRENSA (2004)



Available online at www.sciencedirect.com

in the state

ANALYTICA CHIMICA ACTA

Analytica Chimica Acta xxx (2004) xxx--xxx

SCIENCE DIRECT.

www.elsevier.com/locate/aca

Use of polyoxyethylene-6-lauryl ether and microwave-assisted extraction for the determination of chlorophenols in marine sediments

Cristina Mahugo Santana, Zoraida Sosa Ferrera, José J. Santana Rodríguez*

Department of Chemistry, Foculty of Martne Sciences, University of Las Palmas de Gran Canaria, 35017 Las Palmas de Gran Canaria, Spain Received 8 November 2003; received in revised form 10 February 2004; accepted 12 March 2004

Abstract

Microwave-assisted micellar extraction was optimised and applied to the extraction, prior to analysis by liquid chromatography with diode array spectrophotometric detection, of chlorophenols in marine sediment samples. This study was carried out using a non-ionic surfactant polyoxyethylene-6-lauryl ether as extractant. Parameters studied included surfactant concentration, pH of the solution, extraction time and power. Once the method was optimised, it was applied to different spiked marine sediments from coasts of the Canary Islands (Spain). The results obtained indicate that irradiation of 500 W for 2 min achieved the best extraction efficiency (100% recovery) and standard deviation values <10%. Detection limits were obtained in the range 1.2–12.7 µg g⁻¹ for the chlorophenols studied. The proposed method provides a simple, fast and organic solvent-free procedure to analyse for chlorophenols in marine sediment samples.

Keywords: Chlorophenols; Micellar medium; Extraction methods; Microwave; Marine sediments; Liquid chromatography

1. Introduction

Chlorophenols are widely used in the chemical industry for manufacturing polymers, textiles, drugs, and dyes, among others substances. Furthermore, these compounds have substantial applications in agriculture as herbicides, insecticides and fungicides, thus becoming potential pollutants of soils and surface and underground waters owing to their highly hydrophilic nature [1,2].

Chlorophenols have a highly toxic character and it is well known that these substances exhibit properties that are hazardous to human health [3]. Owing to their toxicity and their presence in the environment, some of them, such as 2-chlorophenol, 2,4-dichlorophenol, 2,4,6-trichlorophenol and pentachlorophenol, have been included in the US Environmental Protection Agency (EPA) list of the 11 priority pollutant phenols in waters [4].

Sediments or suspended solids are good adsorbents of phenolic contaminants because of their high surface area and surface activities. The sediments can adsorb and accumulate the compounds in relatively high concentrations and affect a aquatic life. Analysis for the phenolic compounds in sediment or suspended solid samples has therefore been studied extensively because of their importance in the monitoring of environment contamination levels [5].

Many methods for phenol analysis are based on chromatographic techniques, such as liquid chromatography [6,7], gas chromatography [8,9] and capillary electrophore. If [0,11] Before chromatographic measurement can take a place, appropriate sample pre-treatments are usually required to clean up or enrich the species. Conventionally, liquid-liquid extraction and solid-phase extraction have been applied for the pre-treatment of phenolic derivatives in soil samples, whereas the sonication and Soxhleter methods were mainly employed in the determination of pentachlorophenol in wood. Although these extraction methods offer efficient and precise results, they are relatively time-consuming, possibly bazardous to health due to the use of organic solvents, and highly expensive [12].

Microwave-assisted extraction (MAE) is a viable alternative to the conventional techniques and exhibits many substantial improvements in analytical sample preparation, as it requires much smaller volumes of organic solvent, reduces extraction time and increases sample throughput

^{*} Corresponding author. Tel.: +34-928452915; fax: +34-928-452922. E-mail address: jsantana@dqui.ulpgc.es (J.J.S. Rodríguez).

^{0003-2670/5 -} see front matter © 2004 Elsevier B.V. All rights reserved. doi:10.1016/j.aca.2004.03.085

through extraction of multiple samples [13,14]. In the last few years, the number of procedures using extraction of organic compounds from environmental matrices by microwave energy has increased [12,15,16]. Many of these studies made use of experimental design approaches for the optimisation of the MAE procedures [17,18]. The variables considered differ from one publication to another, but the most commonly studied are temperature, extraction time and power, solvent volume and concentration of different types of extracting solvents.

The use of micellar systems, to extract and pre-concentrate organic compounds from aqueous or solid samples, as alternative extractants to organic solvents, offers advantages such as safety, cost, and, compatibility with aqueous-organic mobile phase in liquid chromatography (LC). Micellar media have been applied to the extraction of many compounds present in different environments such as water samples, marine sediments and soils [19–23].

In this study, we used MAE combined with micellar media, hereinafter described as microwave-assisted micellar extraction (MAME), for the extraction of chlorophenols from marine sediments in a closed-vessel system using the non-ionic surfactant polyoxyethylene-6-lauryl ether as extractant. The determination of the chlorophenols was carried out using liquid chromatography with UV (ultraviolet) detection. The parameters studied included surfactant concentration, pH of the solution, and extraction time and power. Once the method was optimised, it was applied to spiked marine sediments from coasts of the Canary Islands (Spain).

2. Experimental

2.1. Reagents

Stock solutions of the phenolic compounds were obtained from Sigma-Aldrich (Madrid) and prepared by dissolving appropriate amounts of the commercial products in methanol. They are listed in Table 1 (numbers identify the compounds in the figures). The standard certified mixture of phenolic compounds no. X 190103 was obtained from the Laboratories Dr. Ebrenstorfer GmbH (Germany) (provided by Imatra, Barcelona, Spain). The non-ionic surfactant used

Table 1

.....

|--|

No.	Compound	Abbreviation	η _k (min)	λ (nm)	
1	Phenol	РН	3.5	270	
2	2-Chlorophenol	2-CP	6.2	280	
3	4-Chlorophenol	4-CP	7.5	280	
4	4-Chlorometaresol	4-CMC	9.9	280	
5	2,4-Dichlorophenol	2,4-DCP	10.8	290	
6	4-Chloro-3,5-dimethylphenol	4-C-3,5-DMP	12.1	280	
7	2,4,6-Trichlorophenol	2,4,6-TCP	13.5	290	
8	Pentachlorophenol	PCP	18.2	303	

in this study, polyoxyethylene-6-lauryl ether ($C_{12}E_6$), was obtained from Sigma-Aldrich (Madrid) and prepared in de-ionised water. Methanol HPLC-grade was obtained from Panreac Química S.A. (Barcelona).

All solvents and analytes were filtered through a 0.45 μ m nylon membrane filter and ultra-high-quality water obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore Corp.) was used throughout.

2.2. Apparatus

The chromatograph system consists of two Waters 510 pumps fitted with a Waters injector model Rheodyne 7725 i pump with a 20 µL sample loop and a Waters 996 photodiode array detector (Waters Cromatografia S.A. Barcelona). The system and the data management were controlled by Millennium software from Waters. The stationary-phase column was a Waters Nova-Pack C18, 3.9×150 mm i.d. 4 µm particle diameter. The analytical column and the mobile phase reservoir were water-jacketed and thermostated at 25 ± 1 °C with a circulating water bath.

The microwave oven used in this study was a Multiwave (Anton Paar, Graz, Austria) with a 6 EVAP rotor and 6 MF100 vessels (Anton Paar).

2.3. Procedures

2.3.1. Preparation of spiked sediments

Marine sediments were collected from different parts of the coastline of the Canary Islands. After sieving, fractions of sediments with particle size <0.3 mm, Las Canteras beach (Gran Canaria Island) and Jandia beach (Fuerteventura Island), and 0.1 mm, Taliarte harbour (Gran Canaria Island) were taken. These sediments were washed with Milli-Q water and dried in an oven. These sediment samples were spiked as follows: 2g of sediment was spiked with a volume of the chlorophenols dissolved in methanol to obtain a concentration of each analyte at $2 \mu g g^{-1}$. The samples were stored in the dark at room temperature for 24 h before analysis.

The aged spiked samples were prepared as follows: the mixture of phenolic derivatives dissolved in 25 mL of methanol was added to 20 g of sediment. After it was mixed thoroughly, the sample was stored at 4 °C for 6 months before the first extraction. The concentrations in the sediment were between 1.14 and 1.65 μ .gg⁻¹. It was assumed that the phenols were uniformly distributed in the sample and that, as the sediment still retained residual moisture throughout the storage period, any analyte-matrix interactions would have occurred over the ageing period and to a similar extent to those in real contaminated sediments with similar properties.

2.3.2. Microwave-assisted extraction

Once the sediment sample was transferred to the vessel, 4 mL of the surfactant solution was added and the sediment was subjected to MAE. After this, the vessels were allowed to cool to room temperature (10-15 min) before opening. The extracted solution was filtered with a 0.45 μ m syringe-driven filter and transferred to a glass tube before injection.

2.3.3. Liquid chromatographic analysis with UV detection

For the separation of the eight chlorophenols mixture, the eluent used was methanol-water (40:60, v/v) increasing to 100% methanol in 20 min. The eluent used for separating the mixture of 14 phenolic derivatives (mixture 2) was water (with 1% acetic acid)-methanol (70:30, v/v) for 16 min (isocratic), increasing to 100% methanol in 24 min. In both instances, the flow rate was 1 mL min⁻¹.

The separation and determination of the compounds under study were performed by injecting 20 μ L of extracts obtained into the liquid chromatograph and the absorbance for each analyte, corresponding to the wavelength maximum, was measured. The retention time and the wavelength for each compound are listed in Table 1. The range of calibration concentration was between 100 and 1500 μ g L⁻¹.

2.3.4. Statistical analysis

All statistical tests (analysis of variance (ANOVA), experimental design) were performed using Statgraphics plus software, version 4.0 (Manugistic, Rockville, MD).

3. Results and discussion

Optimisation of MAE conditions has been reported in several applications. Many studies have used factorial, central composite and orthogonal array designs to find optimal conditions [24].

In this study, the variables considered in the MAME optimisation process were surfactant concentration, surfactant volume, pH of the solution, extraction time and power. To optimise the MAME procedure, we chose marine sediments from Taliarte harbour.

3.1. Surfactant volume

In some cases solvent volume may be an important parameter for efficient extractions. The solvent volume must be sufficient to ensure that the entire sample is immersed [25]. The surfactant volume-sample amount ratio was investigated by varying the volume of surfactant and keeping the sample mass constant. We studied four different ratios: 2, 4, 8 and 12 mL of surfactant solution and 2 g of sample. The results obtained showed that 2 mL is not enough to wet the sample; however, the recoveries achieved with the others solvent volumes were similar. Therefore, if the sample is fully immersed in the solvent, an increase of the solvent volume does not seem to have any influence on the extraction percentages. We chose 4 mL of surfactant for subsequent studies.



Fig. 1. Influence of the final concentration of surfactant on the recovery percentages of some chlorophenols.

3.2. Surfactant concentration

Four concentrations were studied to establish the effect of this parameter on the extraction process. This initial study was carried out using a power of 200 W and a time of 2min. The recoveries obtained are 60% higher, even with the lowest surfactant concentration. Even though the highest recovery percentages were obtained with 5% (v/v) surfactant (Fig. 1), 2% (v/v) was chosen to study the influence of microwave irradiation conditions, time and power on the extraction process. Very acceptable recovery percentages were obtained with this surfactant percentage.

3.3. pH of the solution

When working with sediment samples, the extraction process might also be influenced by the pH. The pH of the extracting solution can alter the ionic form of the analytes under study. To investigate the effect of this parameter on the process, samples containing 2 g of sediment in acidic and basic media were subjected to MAE using a surfactant concentration of 2% (v/v) and the power and time mentioned above. The results obtained, after analysing the extracted solutions, indicated that the basic medium slightly enhanced the extraction of Ph and 2-CP, while in the case of the other chlorophenols, the pH had no effect on the recoveries. It was therefore decided not to modify the initial pH of the solution.

3.4. Optimisation of microwave irradiation conditions

In closed vessels system, the chosen power setting depends on the number of samples to be extracted during one extraction run. The power must be chosen correctly to avoid excessive temperatures, which could lead to solute degradation and overpressure inside the vessels. This parameter is of prime importance in ensuing efficient extraction as it has to allow the diffusion of the solvent into the interior parts of the matrix as well as enhanced desorption of the components from the active sites of the matrix.



Table 2

See and the second and a second					
Run	Power (W)	Time (min)			
1	100	2			
2	100	8			
3	100	14			
4	300	2			
5	300	8			
6	300	8			
7	300	8			
8	300	14			
9	500	2			
10	500	8			
11	500	14			

ning design



Fig. 2. Response surface for the effect of time and power on the extraction of 2,4-dichlorophenol.

As in other extraction techniques, time is another parameter whose influence needs to be taken into account. Extraction times in MAE are very short compared to conventional techniques; often 10 min is sufficient, but even 3 min has been demonstrated to give full recovery for pesticides from soils and sediments [26,27].

The influence of the irradiation power and the irradiation time of microwaves on the extraction were investigated using a factorial design. This model allows the direct evaluation of the variables considered. Moreover, the application of a statistical approach using a factorial design can both reduce the development time and provide less ambiguous data. We used a central composite design, 22 + star with three central points. The experimental design involving 11 runs (Table 2) was used as an approach to the response surface of the microwave extraction process [28]. Other variables involved in the extraction process were kept constant: surfactant concentration, 2% (v/v), surfactant volume, 4 mL, and sediment amount, 2 g. The concentration of phenolic compounds spiked was also kept constant: $2 \mu g g^{-1}$.

Fig. 2 shows the response surface for 2,4-dichlorophenol. Results indicated that the best recoveries are in the region of high powers and short times. Response surfaces modelled for the other chlorophenols lead to the same conclusions. Consequently, we chose an irradiation power of 500 W and an extraction time of 2 min.



Fig. 3. Elution of the mixture of eight chlorophenols. Chromatographic conditions as described in the text. The numbering refers to Table 1.

Compound	LOD	RSD	Recovery (%) (certified standard)
PH	5.1	6.41	94.7
2-CP	4.2	9.51	91.2
4-CP	11.7	3.79	_•
4-CMC	9.8	4.51	96.6
2.4-DCP	8.3	3.33	96.1
4-C-3,5-DMP	12.7	2.53	و
2,4,6-TCP	1.2	3.77	101.8
PCP	8.0	4.38	102.2

LOD: limit of detection (2 x noise) in μgg^{-1} ; RSD: relative standard deviation (n = 6).

* Compounds not available in certified standard

3.5. Liquid chromatographic analysis

The analysis of the extracted samples was carried out using liquid chromatography with UV detection. The eluent used was methanol-water (40:60, v/v) increasing to 100% methanol in 20 min. The flow rate was 1 mL min⁻¹.

The chromatogram obtained for the mixture of cblorophenols is shown in Fig. 3. It can be observed that this mobile pbase allows a good separation of analytes and a short analysis time.

The corresponding calibration graphs for each analyte were obtained by duplicate injection of the sample containing 2% (v/v) polyoxyethylene-6-lauryl ether, 5% (v/v) methanol and the corresponding analyte concentration. Concentrations ranged between 100 and 1500 $\mu g \, L^{-1}.$ A linear relationship was obtained between peak areas and the analyte concentrations, with high correlation coefficients (0.995). The relative standard deviations were calculated for six samples, to which the MAME process was applied, and are shown in Table 3, together with detection limits values. The results obtained indicate standard deviation values <9.5%.

The detection limits [29] were calculated as twice the noise for each phenolic compound, and varied between 1.2 and 12.7 μ g L⁻¹ for all compounds studied.

Once the MAME conditions were optimised, sediment samples were spiked with a standard certified mixture of eleven phenols. The extraction procedure was applied to test the validity of the proposed method. The concentrations obtained (Table 3) were similar to the certified values.

3.6. Analytical applications

As the chlorophenols exhibit different behaviour in terms of acidity and polarity, different interactions between matrix and analytes occur. In order to study whether the experimental conditions defined to analyse a restricted set of chlorophenols may be adequate to analyse for other molecules of the same group, the MAME procedure was applied to a new mixture of phenolic derivatives.

This new mixture, with 14 compounds, included nitrophenols and methylphenols. Three sediment samples were spiked with this mixture: Taliarte harbour, Las Canteras beach and Jandía beach. These samples have different characteristics: particle size, organic matter, carbonates amount and ferrous materials. The selected concentration level for spiking was the one typical of acute pollution events that may occur in industrial sites [30]. The sediments were spiked 24 h before extraction. Table 4 shows the recoveries obtained in the extraction of these compounds from the three types of sediments. It can be observed that, although the recovery percentages for the analytes under study are very satisfactory in general, the values achieved for the sediment from Jandía beach are lower for some analytes. The main difference between this type of sediment and the others is a higher amount of carbonates and lower ferrous materials.

Decreasing recoveries resulting from ageing of matrices is a well-known phenomenon [31]. It can be explained by

•	۰.	ч	-
		н	~
 			~

Table 3

5

Compound	Abbreviation	Recovery (%)	Recovery (%)		
		Las Canteras	Jandía	Taliarte	
Phenol	рн	102.9 ± 6.4	94.2 ± 6.4	103.6 ± 6.4	
4-Nitrophenol	4-NP	114.3 ± 4.8	108.7 ± 4.8	115.8 ± 4.8	
2,4-Dinitrophenol	2,4-DNP	115.6 ± 5.2	101.1 ± 5.2	118.1 ± 5.2	
Paracresol	PC	105.8 ± 6.2	80.8 ± 6.2	106.5 ± 6.2	
2-Nitrophenol	2-NP	106.9 ± 4.9	85.7 ± 4.9	116.2 ± 4.9	
2-Chlorophenol	2-CP	113.5 ± 9.5	74.8 ± 9.5	114.8 ± 9.5	
4-Chlorophenol	4-CP	80.6 ± 3.8	111.1 ± 3.8	111.0 ± 3.8	
2,4-Dimethylphenol	2,4-DMP	101.9 ± 5.8	92.3 ± 5.8	88.2 ± 5.8	
4,6-Dinitroorthocresol	4.6-DNOC	110.2 ± 5.0	103.1 ± 5.0	119.5 ± 5.0	
4-Chlorometacresol	4-CMC	107.3 ± 4.5	99.9 ± 4.5	113.0 ± 4.5	
2,4-Dichlorophenol	2,4-DCP	105.5 ± 3.3	96.3 ± 3.3	108.6 ± 3.3	
4-Chloro-3,5-dimethylphenol	4-C-3,5-DMP	104.1 ± 2.5	94.3 ± 2.5	107.7 ± 2.5	
2,4,6-Trichlorophenol	2,4,6-TCP	111.3 ± 3.8	101.5 ± 3.8	102.7 ± 3.8	
Pentachlorophenol	PCP	96.7 ± 4.4	89.2 ± 4.4	112.5 ± 4.4	

* Chromstographic conditions: water (with 1% acetic acid)-methanol (70:30) for 16 min (isocratic), increasing methanol in 24 min; flow rate: 1 mL min-1. Concentration of each added analye: 2 µgg-1.

C.M. Santana et al. / Analytica Chimico Acta xxx (2004) xxx-xxx



Fig. 4. Recoveries of phenolic derivatives from spiked marine sediments after different storage periods.

analytes being more strongly bound to the matrix than those spiked due to longer contact times. In order to study the ageing effects, we applied the MAME procedure to a marine sediment (Taliarte harbour) 6 months after the samples were spiked. Fig. 4 shows the recoveries obtained for fresh samples and aged samples. We found slightly lower, but acceptable recoveries on ageing. Most compounds were extracted with a recovery >60%.

A comparison between the results achieved with aged samples using different surfactants, polyoxyethylene-10lauryl ether and polyoxyethylene-9-lauryl ether, shows that when the storage period is 3 months, these results are higher than the results obtained with 6-month-old samples. It can be explained according to whether the analytes are incorporated by adsorption (short periods) or by sequestration (longer period) [32]. The former phenomenon is involved at the early stages of sorption, where H-bonding and van der Waals forces prevail. On the other hand, sequestration involves sorption at remote microsites within the soil matrix [33].

4. Conclusions

The results obtained in this work demonstrate that MAE with a micellar medium is a viable alternative to other extraction techniques. The main advantages of MAME are shorter extraction times, higher sample throughput and the use of organic solvents not being required, resulting in reduced cost and toxicity.

The methodology developed allows the simple, fast and selective determination of phenolic derivatives, including eleven compounds considered priority pollutants by the EPA, in marine sediments.

Acknowledgements

This study was funded by the Spanish Ministry of Science and Technology Project no. PPQ2002/04683.

References

- [1] D. Puig, D. Barceló, Trends Anal. Chem. 15 (1996) 362.
- [2] G.A. Marko-Varga, in: D. Barceló (Ed.), Environmental Analytical Techniques—Applications and Quality Assurances, Elsevier, Amsterdam, 1993.
- [3] G.L. Puma, P.L. Yue, Ind. Eng. Chem. Res. 38 (1999) 3238.
- [4] EPA Method 604 Phenols in Federal Register, Friday 26 October 1984, Environmental Protection Agency, Part VIII, 40 eFR Part 136, p. 58.
- [5] D. Li, J. Oh, J. Park, J. Chromatogr. A 1012 (2003) 207.
- [6] P.G. Wightman, J.B. Feit, Appl. Geochem. 14 (1999) 319.
- [7] D. De Almeida Azevedo, S. Lacorte, T. Vinhas, P. Viana, D. Barcelo, J. Chromatogr. A 879 (2000) 13.
- [8] M.R. Lee, Y.C. Yeh, W.S. Hsiang, B.H. Hwang, J. Chronnatogr. A 806 (1998) 317.
- [9] A. Buhr, C. Genning, T. Saltharamer, Frescrius J. Anal. Chem. 367 (2000) 73.
- [10] L. Fang, X. Xu, Int. J. Environ. Anal. Chem. 77 (2000) 29.
- [11] O. Jauregui, L. Puignou, M.T. Galceran, Electrophoresis 21 (2000)
- 611.
- [12] M. Wei, J. Jen, J. Chromatogr. A 1012 (2003) 111.
- [13] V. Lopez-Avila, R. Young, N. Teplinsky, J. AOAC Int. 79 (1996) 142.
 [14] M. Letellier, H. Budzinski, Analyst 124 (1999) 5.
- [15] M.A. Crespin, M. Gallego, M. Varcárcel, J. Chromatogr. A 897 (2000) 279.
- [16] R. Tukai, W.A. Maher, I.J. McNaught, M.J. Eliwood, Anal. Chim. Acta 457 (2000) 173.
- [17] M.P. Llompart, R.A. Lorenzo, R. Cela, J.R. Jocelyn Paré, Analyst 122 (1997) 133.
- [18] A. Eguizabal, O. Zuloaga, N. Ettevarría, L.A. Fernández, J.M. Madariaga, Analyst 123 (1998) 1679.
- [19] V. Pino, J.H. Ayala, A.M. Afooso, V. González, Int. J. Environ. Anal. Chem. 81 (2001) 281.
- [20] V. Pino, J.H. Ayala, A.M. Afonso, V. González, J. Chromatogr. A 869 (2000) 515.
- [21] A. Eiguren Fernández, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodríguez, Anal. Chim. Acta 433 (2001) 237.
- [22] C. Padrón, A. Eiguren, Z. Sosa, J.J. Santana, J. AOAC Int. 85 (2002) 44.
 [23] A.B. Prevot, M. Gulmini, V. Zelano, E. Pramauro, Anal. Chem. 73
- (2001) 3790. [24] C. Sparr Eskilsson, E. Björklund, J. Chromatogr. A 902 (2000)
- 227.
- [25] I.J. Barnabas, J.R. Dean, I.A. Fowlis, S.P. Owen, Analyst 120 (1995) 1897.

ł

1

.

į

3

â

- [26] F.I. Ouutska, K.A. Terry, Chromatographia 36 (1993) 191.
 [27] G. Xiong, J. Liang, S. Zou, Z. Zhang, Anal. Chim. Acta 371 (1998) 97.
- [28] C. Montgomery, in: Design and Analysis of Experiments, 3rd ed., Wiley, New York, 1991 (Chapter 11).
- [29] S. Lindsay, High Performance Liquid Chromanography, Wiley, New York, 1992, p. 71.
- [30] N.M. Laine, H. Haario, K.S. Jorgeosen, J. Microbial. Methods 30 (1997) 21.
- [31] S.B. Hacothorne, E. Björklund, S. Bø wadt, L. Mathiasson, Environ. Sci. Techenol. 33 (1999) 3251.
- J. Dec, J. Bollag, Soil Sci. 162 (1997) 858.
 F. Kopinke, J. Pörschmann, U. Stottmeister, Environ. Sci. Technol. 29 (1995) 941.

EXTRACTION AND DETERMINATION OF PHENOLIC DERIVATIVES IN WATER SAMPLES BY USING POLYOXYETHYLENE SURFACTANTS AND LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH PHOTODIODE ARRAY DETECTION

C. MAHUGO SANTANA, Z. SOSA FERRERA Y J.J SANTANA RODRÍGUEZ J. AOAC INTERNATIONAL 87 (2004) 166

 Table 2. Nonionic surfactents used in this study and their cloud-point temperatures

Surfactant	Clo	ud point, °C	
Polyoxyethylene 6 lauryl ether	(C12E6)	60.0 ^e	50.0 ⁶
Polyoxyethylene 9 lauryl ether	(C12E9)	86.6 ⁴	65.0 ^b
Polyoxyethylene 10 lauryl ether	(C12E10)	95.0 ⁴	75.0°

Without NaCl.

With 5% (w/v) NaCl.

" With 7.5% (w/v) NaCl.

listed in Table 1. The concentration range of the calibration curves was between 100 and 1000 μ g/L.

Determination of Phenolic Compounds in Water Samples

Before analysis, seawater and depurated wastewater were successively passed through filters with different porosities $(0.45 \text{ and } 0.22 \mu\text{m})$ and ultraviolet radiation to avoid the possible interference of microorganisms.

Solutions of 10 mL containing 4 mL seawater or depurated wastewater were spiked with suitable amounts of phenolic derivatives and analyzed according to the established CPE method. The values reported are averages of triplicate determinations.

Results and Discussion

Optimization of the Cloud-Point Process

The cloud-point temperature depends on the structure of the surfactant and on its concentration. This temperature can be modified by the presence of salts and other surfactants (11, 14). The effect of these factors on cloud-point efficiency was studied.



The phase diagram for the surfactants under study is shown in Figure 1. The consolution curves show a sharp decrease in temperature up to a concentration of around 2% (v/v). These results are in line with those found for other polyoxyethylated nonionic surfactants, for which the cloud-point temperature increases as the length of the ethylene oxide moiety increases.

The presence of salts can alter the cloud-point temperature of aqueous surfactant solutions. In fact, adding 5% (w/v) NaCl to the surfactant solutions decreases the cond-point temperatures. Table 2 summarizes the cloud point temperatures of the nonionic surfactants used, with anowithout NaCl.

The volume of the extraction layer (c) not on the nature of the surfactant and its concentration (i.e). The results of this study indicate that the volume of the surfactant-rich phase increases as the surfactant concentration in solution increases and the number of ethylene or results increases. Therefore, the use of $C_{12}E_6$ allows a higher preconcentration factor than does the use of the other surfactants at the same concentration.

Optimization of the Extraction Process

Many experimental parameters can alter the extraction efficiency and the preconcentration factor of the CPE process (15). The effects of the following experimental factors were studied: nature of the surfactant (ethylene oxide chain length), surfactant concentration, quilibration time, pH, and ionic strength.

Effect bicurfactant nature (ethylene oxide chain).—The extraction the interval of the interval of the interval becomes more polar, that is, when the number of ethylene oxide poieties present in the nonionic surfactant molecule inreases (16). The surfactants studied had the same alkyl group of a different number of ethylene oxide units; thus, the one with the fewest number of ethylene oxide moieties will extract solutes more effectively. Figure 2 shows the extraction percentages for some phenolic derivatives of different polarities





Figure 1. Phase diagram for the surfactants studied. The region above the consolution curve is a 2-phase region, 2 L; L denotes the single isotropic solution region.

Figure 2. Dependence of the extraction percentage of some phenolic compounds on the number of ethylene oxide moleties present in a series of $C_{12}E_1$ nonionic surfactants.

.VP, Author's Galley

© Copyright 2003 by AOAC INTERNATIONAL. This proof is NOT for further distribution.

Table 1. Phenolic derivatives, retention times, and wavelengths used in this study

				t _R ,min*		
No.	Compound	Abbreviation	λ,,nm	Mobile phase 1	Mobile phase 2	
1	Phenoi	РН	270	5.3	3.5	
2	4-Nitrophenol	4-NP	315	8.7		
3	2,4-Dinitrophenol	2,4-DNP	270	10.3	6.	
4	p-Cresol	PC	280	10.3	A	
5	2-Nitrophenol	2-NP	280	12.9		
6	2-Chlorophenol	2-CP	280	14.0	6.1	
7	4-Chlorophenol	4-CP	280	19.5	7.4	
8	2,4-Dimethylphenol	2,4-DMP	280	24.7	O –	
9	4,6-Dinitro-o-cresol	4,6-DNOC	270	25.3	-	
10	4-Chloro-m-cresol	4-CMC	280	28.1	9.4	
11	2,4,6-Trimethylphenol	2,4,6-TMP	280	2	_	
12	2,4-Dichlorophenol	2,4-DCP	290	ZBA Y	10.8	
13	4-Chloro-3,5-dimethylphenol	4-C-3,5-DMP	280	A 31.4	12.0	
14	2,4,6-Trichlorophenol	2,4,6-TCP	290	3.0	13.3	
15	Pentachlorophenol	PCP	303	38.2	17.5	

t_R = retention time.

ter. NaCl and LC-grade methanol were obtained from Panreac Química S.A. (Barcelona, Spain).

All solvents and analytes were filtered through a 0.45 µm nylon membrane filter, and ultrahigh-quality water obtained from a water purification system was used throughout. Tab

Apparatus

The LC system consisted of 2 Waters Model 510 propfitted with a Rheodyne Model 7725 injector (Wate's Chiomatographic S.A., Barcelona, Spain) with a 200 prosample loop and a Waters Model 996 photodiode array director. Millennium software from Waters was used to complete system and for data management. The stationary-phase column was a Waters Nova-Pack C18, 3.9×150 mm idform particle diameter. The analytical column and the mobile phase reservoir were water-jacketed and thermostate anticle at $25 \pm 1^{\circ}$ C with a circulating bath.

A thermostat-controlled bath (Tection Model 200) and a centrifuge (Mixtasel) from Schroe (Barcelona, Spain) were also used.

Cloud-Point Determinition

The cloud points for the different surfactant solutions were determined by varying incremperature 5°C every 10 min until phase separation was observed. The phase diagrams or consolution curves were obtained by measuring the cloud-point temperature as a function of surfactant concentration.

Ratio of Phases

The ratio of the volume of the aqueous phase (V_w) to the volume of the surfactant-rich phase (V_s) , V_w/V_s , was mea-

sure or nuces calibrated for solutions with different amounts of surfactant. The tubes were heated 15°C above the critical emphasize for 10 min and then centrifuged at 3500 rpm for

Extraction and Preconcentration

Aliquots (10 mL) of the analytes with different surfactants in NaCl aqueous solution were kept in a controlled-temperature bath. The pH was adjusted by adding 1% acetic acid. Separation of the 2 phases was achieved by centrifuging at $1921 \times g$ for 5 min.

To determine the extraction percentage, after phase separation, 0.5 mL methanol and water were added to the surfactant-rich phase until the initial volume was obtained, and 20 μ L of this solution was injected into the LC system.

Liquid Chromatography with UV Detection

Two mobile phases were used. The eluant used to separate the mixture of 14 phenolic derivatives (mixture 1) was methanol-water (with 1% acetic acid; 30 + 70) for 16 min (isocratic) to 100% methanol in 24 min (mobile phase 1). The eluænt used to separate the mixture of 8 chlorophenols (mixture 2) was methanol-water (with 1% acetic acid; 40 + 60) up to 100% methanol in 20 min (mobile phase 2). In both instances, the flow rate was 1 mL/min.

The compounds under study were separated and determined by directly injecting 20 µL solution into the liquid chromatograph and measuring the absorbance of each analyte at the appropriate maximum wavelength. The retention time and the wavelength for each compound and mobile phase are

 Table 2. Nonionic surfactants used in this study and their cloud-point temperatures

Surfactant	Clo	ud point, °C	;
Polyoxyethylene 6 lauryl ether	(C12E6)	60.0 ^a	50.0 ⁶
Polyoxyethylene 9 lauryl ether	(C12E9)	86.6 ^e	65.0 ^b
Polyoxyethylene 10 lauryl ether	(C12E10)	95.0 [#]	75.0°

* Without NaCl.

With 5% (w/v) NaCl.

" With 7.5% (w/v) NaCl.

listed in Table 1. The concentration range of the calibration curves was between 100 and 1000 μ g/L.

Determination of Phenolic Compounds in Water Samples

Before analysis, seawater and depurated wastewater were successively passed through filters with different porosities $(0.45 \text{ and } 0.22 \mu m)$ and ultraviolet radiation to avoid the possible interference of microorganisms.

Solutions of 10 mL containing 4 mL seawater or depurated wastewater were spiked with suitable amounts of phenolic derivatives and analyzed according to the established CPE method. The values reported are averages of triplicate determinations.

Results and Discussion

Optimization of the Cloud-Point Process

The cloud-point temperature depends on the structure of the surfactant and on its concentration. This temperature can be modified by the presence of salts and other surfactants (11, 14). The effect of these factors on cloud-point efficiency was studied.



The phase diagram for the surfactants under study is shown in Figure 1. The consolution curves show a sharp decrease in temperature up to a concentration of around 2% (v/v). These results are in line with those found for other polyoxyethylated nonionic surfactants, for which the cloud-point temperature increases as the length of the ethylene oxide moiety incre**figs**.1

The presence of salts can alter the cloud-point temperature of aqueous surfactant solutions. In fact, adding 5% (w/v) NaCl to the surfactant solutions decreases the orad-point temperatures. Table 2 summarizes the cloud-point temperatures of the nonionic surfactants used, with and without NaCl.

The volume of the extraction layer (spinds on the nature of the surfactant and its concentration (10). The results of this study indicate that the volume of the surfactant-rich phase increases as the surfactant concentration in solution increases and the number of ethylene or the number increases. Therefore, the use of $C_{12}E_6$ allows a baser preconcentration factor than does the use of the other statictants at the same concentration.

Optimization of the Extraction Process

Many experimental parameters can alter the extraction efficiency and the preconcentration factor of the CPE process (15). The effects of the following experimental factors were studied: so nature of the surfactant (ethylene oxide chain length), surfactant concentration, quilibration time, pH, and ionic strength.

Effet Scarfactant nature (ethylene oxide chain).—The extraction ficiency decreases when the surfactant molecule becomes nore polar, that is, when the number of ethylene oxide poieties present in the nonionic surfactant molecule inreases (16). The surfactants studied had the same alkyl group of a different number of ethylene oxide units; thus, the one on the fewest number of ethylene oxide moieties will extract solutes more effectively. Figure 2 shows the extraction percentages for some phenolic derivatives of different polarities.



Figure 1. Phase diagram for the surfactants studied. The region above the consolution curve is a 2-phase region, 2 L; L denotes the single isotropic solution region.

Figure 2. Dependence of the extraction percentage of some phenolic compounds on the number of ethylene oxide moleties present in a series of $C_{12}E_1$ nonionic surfactants.



Figure 3. Extraction percentages obtained for chlorophenols by using the 3 surfactants studied.

such as PH and 2-CP, the most polar compounds, and 2,4-DCP and 2,4,6-TCP, more hydrophobic solutes, at a surfactant concentration of 5% (v/v). In fact, the recovery percentage of each analyte increased when the ethylene oxide chain length of the surfactant decreased. It was found that this behavior was the same for all compounds studied, independent of polarit**Fig 2**

Effect of equilibration time.—The time that the analytes have to interact with micelles and get into their core is another factor that greatly influences the recovery percentage (17). In the case of the most hydrophobic solutes, the extraction recentages were essentially the same for all surfactants in the time range studied. With respect to the more polar components, the $C_{12}E_6$ and $C_{12}E_9$ surfactants required a short time period to extract the analytes.

Effect of ionic strength.-The addition of an iner-inte the phase separation process for some non-Surfactant systems, because it increases the density of the bilk aducous phase (6, 18, 19). It has been reported that increases a ionic strength, at low salt concentrations, did not appreciate change the extraction used (20). Nevertheless, of analytes when the CPE technique was the results obtained in our study, indicate the addition of higher salt concentrations, in a range be and 12.5%, increases the extraction of analytes and this inc is greater in the case of the 2 more polar solutes.

Effect of surfactant oncernation.—This study shows that the recovery percentages of all the analytes studied increase as the surfactant concentration increases. More specifically, it was observed that in the case of the more hydrophobic solutes, such as 2,4,6-TCP, it was possible to obtain recoveries between 75 and 100% when the surfactant concentration was >1% (v/v) and $C_{12}E_6$ and $C_{12}E_9$ were the extractants; however, only a $C_{12}E_{10}$ concentration of >3% (v/v) resulted in these same recovery values. For more polar solutes, such as PH, a greater increase in the recoveries was obtained when the surfactant concentration was increased from 1 to 3% (v/v), whereas a smaller increase was observed between 3 and 5% (v/v).

Once the conditions were optimized, the CPE was applied to a mixture of 8 chlorophenols to compare the extractant capability of the 3 surfactants under study. Figure 3 shows the extraction percentages obtained for each compound with the 3 surfactants tested. Although the recovery percentages are fairly good in most cases, $C_{12}E_6$ appears to be the best extractants. Fig 3

Optimization of the Preconcentration

For $C_{12}E_9$ and $C_{12}E_{10}$, a surfactant conce atration of between 3 and 5% (v/v) needs to be used to bt in satisfactory Under has recovery percentages. conditions, а surfactant-rich phase volume of anot hately 1 mL is obtained, and a preconcentration fector of 10 times could be reached. However, up to 2 mJ and water needs to be added to the surfactant-rich ase to reduce its viscosity. This allows all the components of mixture 1 to be satisfactorily sep-arated, with a preconcess and n factor of 5. To achieve a greater preconcentration factor of some phenolic derivatives, we prepared a monthing 8 chlorophenols (mixture 2). To extract an preconcentrate this mixture, we needed only to dilution it to a final volume of 1 mL. Then a preconcentration of 10 was obtained.

However, the use of $C_{12}E_6$ requires a lower surfactant concentration that 1% (v/v), to achieve reasonable recovery percentee. This allows greater preconcentration factors because the concentration of the surfactant-tich phase is lower. The 0.25 mL of methanol has been added to reduce the visnesity, the analytes present in both mixtures can be perconcentrated with a preconcentration factor of 20 when this surfactant concentration is used.

LC Analysis

Mixture 1 was separated by using a methanol-water gradient: isocratic elution was performed for 16 min with methanol-water



Figure 4. Elution of mixture 1 (14 phenois), containing each phenol at 0.8 mg/L. The chromatographic conditions are as described in the text, and the peak identities are given in Table 1.

Table	3.	Analytical	characteristics	of the method"	
-------	----	------------	-----------------	----------------	--

Compound	LOD, µg/L ⁶	RSD, %°
PH	0.6	7.41
4-NP	1.0	5.25
2,4-DNP	1.0	6.20
PC	2.5	4.56
2-NP	1.7	6.35
2-CP	2.5	7.23
4-CP ^d	2.5	6.22
2,4-DMP	2.0	6.41
4,6-DNOC	1.3	6.74
4-CMC	1.4	4.26
2,4,6-TMP	3.5	7.30
2,4-DCP	2.5	7.31
4-C-3,5-DMP	3.0	2.25
2,4,6-TCP	2.7	7.65
PCP	3.0	5.30

* Chromatographic conditions: mobile phase 1.

Preconcentration factor of 20.

″ *n* ≕ 6.

Chromatographic conditions: mobile phase 2.

(with 1% acetic acid; 30 + 70) to achieve the separation of the first 6 phenols; after that, the more hydrophobic phenols were eluted by a step gradient to 100% methanol in 24 min The chomatogram obtained for this mixture of phenols by using $C_{12}E_6$ as the extractant (Figure 4) shows that these mobile phases allow good separation of the analytes in a short time. Fig 4

For the separation of the 8 chlorophenols, mature 2, the gradient profile was initially methanol-water (with 1% acetic acid; 40 + 60), reaching 100% methanol at 2 min.

Analytical Applications

Because $C_{12}E_6$ achieved the highest preconcentration factor for the analytes under study, this so factant was chosen to determine the phenolic derivatives in different types of water.

The corresponding calibration of the sample containing a surfactant concentration of 1% (ν/ν), 5% (ν/ν) methanol, and the analyte concentration of 1% (ν/ν), 5% (ν/ν) methanol, and the analyte concentration in the range of 100–1000 µg/L. A linear relationship was obtained between peak areas and analyte concentration, with high correlation coefficients (0.999). The relative transform with high correlation coefficients (0.999). The relative transform with high correlation coefficients (0.999). The relative transform with high correlation (RSD) was calculated for 6 samples, to which the complete procedure (CPE, preconcentration and chromatographic separation) was applied for all compounds studied; values between 2.25 and 7.65% (Table 3) were obtained. The limits of detection (LODs; 2), shown in Table 3, were calculated as twice the noise reach phenolic compound in an aqueous solution of statistical and NaCl by using CPE methodology. These detections is the statistical context of the statistical context of the statistical context of the statistical context of the two statistical context of the statistical c

Table 4. Recovery of phenolic compounds from water solved with a standard certified mixture and from seawater and depurated wastewater spiked with the phenolic derivatives studied

	X	Mean recovery, % ^e	
Compound	Water ^b	Seawater	Wastewater
PH	48.	43.8	40.9
4-NP	A 3	70.5	79.0
2,4-DNP		62.0	65.7
PC	Q^{2}	67.6	_c
2-NP	56.0	56.5	67.6
2-CP	67.7	76.3	79.0
4-CP	~ -	102.4	114.8
2,4-DMP	73.6	72.9	_°
4,6-DNOC	92.4	85.7	72.0
4-CMC	99.8	100.0	101.2
2,4,6-TMP	▼ _	103.1	_°
2,4-DCP	110.4	101.3	104.9
4-C-3,5-DMP	_	100.1	108.5
2,4,6-TCP	73.0	82.9	87.2
PCP	87.9	102.1	99.9

• n = 3.

Spiked with a standard certified mixture.

Not determined because of the high interference of the matrix.

tion limits are within the range required in the analysis of. surface waters for these compounds. Tab 3

To validate the developed method, a standard certified mixture of 11 phenols at 50 μ g/L was prepared in 10 mL of a 1% (v/v) aqueous solution of C₁₂E₆ and 5% (w/v) NaCl, and the complete extraction procedure was applied. After the CPE step, 20 μ L extracted surfactant-rich phase, previously diluted, was injected directly into the LC system. The results are shown in Table 4. Tab 4

Finally, the proposed method was applied to the determination of phenols in 2 kinds of water samples, sea water from the southwestern area of Gran Canaria Island (Canary Islands, Spain) and depurated wastewater. Both samples were previously spiked with the mixture of phenolic derivatives at 50 μ g/L. The results shown in Table 4 indicate very satisfactory recoveries of all phenolic compounds present in the mixtures.

Conclusions

The results obtained with the proposed method indicate that the CPE methodology is a good alternative extraction technique, and it offers a series of highly interesting advantages from an analytical point of view, such as the possibility of extracting and preconcentrating analytes of different polarities in only one step; the preconcentration factor can be optimized by modifying the concentration and type of surfactant as well as the experimental conditions for extraction and phase separation; surfactants are less toxic and less expensive than the organic extractants used in liquid-liquid extraction The most commonly used surfactants are commercially available, and because it is not necessary to remove the solver the evaporation, no analyte is lost as a result of this prog nally, the experimental operations involved in this m ogy are very simple, and the surfactant-ric compatible with the mobile phases used in LC

Acknowledgments

This work was supported by funder povided by the Autonomous Government of the Canary Islams and the Ministry of Science and Technology (Spain for OK AS CHANGED?) Research Projects No. PI2000/04, and PPQ 2002/04863, respectively.



References

(PLEASE SUPPLY ENDING PAGE NUMBERS FOR ALL JOURNAL ARTICLES.)

- Czuczwa, J., Leuenberger, C., Tremp, J., Giger W., & Ahel, M. (1987) J. Chromatogr. 403, 233-241
- (2) Hennion, M.C., Cau-Dit-Coumes, C., & Pichon, V. (1998) J. Chromatogr. A 823, 147-161
- (3) Hennion, M.C. (1999) J. Chromatogr. A 8566-
- (4) Chiron, S., Fernández Alba, A., & Barcelé D. (1993) Environ. Sci. Technol. 27, 2352- 2 359
- (5) Rodriguez, I., Llompart, M.P., & Cela, (2000) J. Chromatogr. A 885, 291- 304
- (6) Saitoh, T., & Hinze, W.L. (1991) And Shem. 63, 2520-2525
- (7) Froschl, B., Stangl, G., & Niessen, (1997) Fresenius Z. Anal. Chem. 357, 743– 744
- (8) Garcia Pinto, C., Pérez Barón, J.Z., & Moreno Cordero, B. (1995) Anal. Chem. 67, 2603 rg 2 (12)
- (9) Sirimanne, S.R., Bart A. Bart & Patterson, D.G. (1996) Anal. Chem. 68, 1556- Chem.
- (10) Pramauro, E., C. Polyzani, E. (1990) Colloids Surf. 48, 193-208
- (11) Hinze, W.L., Zhan auro, E. (1993) Crit. Rev. Anal. Chem. 24, 133-14-7
- (12) Patnaik, P. (202) A Comprehensive Guide to the Hazardous Properties of Chemical Substances, Van Nostrand Reihold, New York, NY
- Lonkholtom, E., & Lichtenberg, J.J. (1982) Method for Organic Chemical Analysis of Municipal and Industrial Wastewater, U.S. Environmental Protection Agency, PA-6004-82-057, Method 604 (PLEASE GIVE CITY)
- AND STATE OF PUBLICATION) Cincinnati, OH (1) Quina, F.H., & Hinze, W.L. (1999) Ind. Eng. Chem. Res. 38, 4150-4168
- (15) Frankewich, R.P., & Hinze, W.L. (1994) Anal. Chem. 66, 944–954
- (16) Voekel, A., Szymanowski, J., Berger, J., & Ebert, K.J. (1987) Vo QQ Kel J. Chromatogr. 398, 31-41
- (17) Tani, H., Kamidate, T., & Watanabe, H. (1997) J. Chromatogr. A 780, 229- 241
- (18) Hoshino, H., Saitoh, T., Taketomi, H., Yotsuyanagi, T., Watanabe, H., & Tachikawa, K. (1983) Anal. Chim. Acta 147, 339-34 J^{*}
- (19) Pramauro, E. (1990) Ann. Chim. (Rome) 80, 101-109
- (20) Horvath, W.J., & Huie, C.W. (1992) Talanta 39, 487-492
- (21) Lindsay, S. (1992) High Performance Liquid Chromatography, Wiley, New York, NY, p 71

A NEW FAST EXTRACTION METHOD FOR THE DETERMINATION OF PRIORITY PHENOLS FROM MARINE SEDIMENTS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY

C. MAHUGO SANTANA, Z. SOSA FERRERA Y J.J SANTANA RODRÍGUEZ J. CHROMATOGRAPHY SCIENCE ENVIADO PARA SU CONSIDERACIÓN (2004)

A NEW AND FAST EXTRACTION METHOD FOR THE DETERMINATION OF PRIORITY PHENOLS FROM MARINE SEDIMENTS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY

Cristina Mahugo Santana, Zoraida Sosa Ferrera, José J. Santana Rodríguez* Department of Chemistry, Faculty of Marine Sciences, University of Las Palmas de Gran Canaria, 35017, Las Palmas de Gran Canaria, Spain

•

*Corresponding author: E-mail address: <u>isantana@dqui.ulpgc.es</u> Phone: +34 928452915 Fax: + 34 928 452922

ABSTRACT

A new and fast method for the determination of priority phenols in marine sediment samples by HPLC using microwave assisted micellar extraction (MAME) was optimised. This study was carried out using the non-ionic surfactants Polyoxyethylene 9 lauryl ether (Polidocanol) and Genapol X-080 as extractants. Parameters studied included surfactant concentration, solution pH, extraction time and power. Once the method was optimised, it was applied to different spiked marine sediments from of the Canary Islands coastlines (Spain). The results obtained indicate that a power irradiation of 500 W for 2 minutes achieved the best extraction efficiency of about 100 % recovery and less than 10 % RSD. Detection limits were obtained in the 2-20 μ g.g⁻¹ range for the phenols studied. Finally, the proposed method provides a simple, fast and organic solvent-free procedure to analyse phenols from marine sediment samples.

Keywords: Phenols; Extraction methods; Microwave assisted micellar extraction; Marine Sediments.

INTRODUCTION

Phenolic compounds are widely involved in commercial applications, such as coal conversion, petroleum refining, paper manufacturing, dye synthesis and photo processing [1,2]. They also have substantial applications in agriculture as herbicides, insecticides and fungicides. As a result, they are often found in waters [3-5], soils [6] and sediments [6,7]. However, phenolic compounds are not only generated by human activity, they are also formed naturally, e.g., during the decomposition of leaves or wood [8]. Due to the widespread presence of phenolic compounds in our environment and their high toxicity [9], many phenolic compounds are listed as US Environmental Protection Agency (EPA) priority pollutants [10]. Due to the increasing concern to human health, efforts have been devoted to quantitating phenols from environmental samples, such as waste water, sea water, ashes, sediments and soils [11-17]. High-performance liquid chromatography (HPLC) is frequently used for the analysis of phenolic compounds because, unlike in gas chromatography (CG) no derivatization of compounds is needed.[18]. A extraction step is required prior to their determination.

The extraction of organic pollutants from solid samples requires the use of organic solvents, which compete in the release of the analytes retained owing to the high activity of the matrix. The most frequently used methods for the extraction of organic pollutants from that type of samples are the Soxhlet extraction and the use of an ultrasonic bath. Traditional methods use large volumes of solvents under aggressive shaking and/or temperature conditions. Soxhlet extraction is particularly suitable for this type of pollutants that are strongly adsorbed on matrices but requires long extraction times and the use of large volumes of frequently toxics solvents. Moreover, it can degrade the analytes [19,20].

In the last few years, microware-assisted extraction (MAE) has became a viable alternative to the conventional techniques and exhibits many substantial improvements in analytical sample preparations, as it requires much lower volumes of organic solvent, reduces extraction time and increases sample throughput through extraction of multiple samples [21,22]. The number of procedures using extraction of organic compounds from environmental matrices by microwave energy has increased [23-25]. However, the organic solvents are used as

extractant in most of them. An alternative to these type of extractants would be the use of micellar systems. The extraction of organic compounds from solid samples using micellar medium offers advantages such as safety, cost, compatibility with aqueous-organic mobile phase in HPLC, etc. The micellar media have been applied to the extraction of several compounds present in different environments such as water samples, marine sediments and soils [26-30].

In this paper, we present a new and fast method for the determination of priority phenols in marine sediment samples by HPLC using microwave assisted micellar extraction. The optimisation of the variables that affect the extraction of these compounds from marine sediment samples using MAE with micellar medium as extractants were studied. The variables considered differ from one publication to another, but the most commonly studied are temperature, extraction time and power, solvent volume and concentration of different types of extracting solvents. Many of these studies made use of experimental design approaches for the optimisation of MAE procedures [31,32].

We used MAME (microwave assisted micellar extraction), for the extraction of fifteen phenolic derivatives, including the eleven priority listed by EPA, from marine sediments using the non-ionic surfactants Polyoxyethylene 9 lauryl ether (Polidocanol) and Genapol X-080 as extractants.

EXPERIMENTAL

Reagents

Phenolic compounds were obtained from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) and their stock solutions (200 μ g/mL) were prepared by dissolving appropriate amounts of the commercial products in methanol and stored in glass-stoppered bottles at 4°C. Appropriate volumes of the stocks were diluted with methanol to prepare more dilute solutions containing phenols at 50 μ g/mL concentration. They are listed in Table 1 (numbers and abbreviations identify the compounds in figures). The standard certified mixture of phenolic compounds n° X 190103 was obtained from the Laboratories Dr. Ehrenstorfer GmbH (Germany) (provided by

Imatra, Barcelona, Spain). The non-ionic surfactants used in this study, Polyoxyethylene 9 lauryl ether (Polidocanol) and Genapol X-080, were obtained from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) and prepared in de-ionised water. Methanol HPLC-grade was obtained from Panreac Química S.A. (Barcelona, Spain).

All solvents and analytes were filtered through a 0.45 μ m nylon membrane filter and ultra-high-quality water obtained by a Milli-Q (Millipore, USA) water purification system was used throughout.

Apparatus

The chromatograph system consists of two Waters pump 510 fitted with a Waters injector model Rheodyne 7725 i with a 20 μ L sample loop and a Waters 996 Photodiode Array Detector. The system and the data management were controlled by Millenium software from Waters (Waters Cromatografía S.A. Barcelona, Spain). The stationary-phase column was a Waters Nova-Pack C18, 3.9 x 150 mm, 4 μ m particle diameter. The analytical column and the mobile phase reservoir were water-jacketed and thermostated at 25 ± 1° C with a circulating bath.

The microwave oven used in this study was a Multiwave (Anton Paar, Graz, Austria) with a 6 EVAP rotor and 6 MF100 vessels (Anton Paar, Graz, Austria).

Procedures

Preparation of spiked sediments

Marine sediments were collected from different parts of the Canary Islands coastline. After sieving, fractions of sediments with particle size under 0.3 mm, from Las Canteras beach (Gran Canaria Island) and Jandía beach (Fuerteventura Island), and 0.1 mm, from Taliarte harbour, (Gran Canaria Island) were taken. These sediments were washed with purified water and dried in an oven. Uncontaminated sediments (blank samples) were previously analysed and then were spiked as follows: 2 g of sediment was spiked with a volume of the phenols dissolved in methanol to obtain a concentration of each analyte at $2\mu g/g$. The samples were then stored in the dark and air-dry at room temperature for 24 hours before analysis.

The aged spiked samples were prepared as follows: the mixture of phenolic derivatives dissolved in 25 mL of methanol was added to 20 g of sediment. After it was mixed thoroughly, the sample was then stored at 4°C for 3 months before the first extraction. The supernatant solution was removed and analysed to determine the phenolic compounds concentration. The concentrations in the sediment were between 1.14 and 1.65 $\mu g/g$. It was assumed that the phenols were uniformly distributed in the sample and that, as the sediment still retained residual moisture throughout the storage period, any analyte–matrix interactions would have occurred over the weathering period and to a similar extend to those in real contaminated sediments with similar properties.

The results reported are the average of triplicate measurements.

Microwave assisted micellar extraction

Once the sediment sample was transferred to the vessel, 4 mL of the surfactant solution were added and the sediment was subjected to the MAME process. After this, the vessels were allowed to cool down to room temperature, 10-15 minutes, before opening. The extracted solution was filtered with a 0,45 μ m syringe-driven filter and transferred to a glass tube before injection.

Effect of solution pH on the extraction

In order to investigate the effect of solution pH in the extraction of phenolic compounds, 50 μ L of acetic acid 100 %(v/v) or 50 μ L of NaOH 25%(w/v) were added to the spiked sediment samples to obtained an acid or basic medium. Then the sediments were subjected to the MAME process.

Liquid chromatography analysis with UV detection

For the separation of the phenols mixture, the eluent used was water (with 1% acetic acid)-methanol (70:30) for 16 minutes (isocratic), up to 100 % methanol for 24 minutes; the flow-rate was 1 ml.min⁻¹.

The separation and determination of the compounds under study were performed by injecting 20 μ L of extracts obtained into the liquid chromatograph and the absorbance for each analyte, corresponding to the wavelength maxima, was measured. The retention time and the

wavelength for each compound are listed in Table 1. The range of calibration curve concentration was between 100 and 1500 μ g.L⁻¹.

Statistical analysis

All statistical tests (ANOVA, experimental design) were performed using Statgraphics plus software, version 4.0 (Manugistic, Rockville, MD, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

Optimisation of MAE conditions has been reported in several applications. Many studies have used factorial, central composite and orthogonal array designs to find optimal conditions [33].

In this study, the variables considered in the MAME optimisation process were surfactant concentration, surfactant volume, pH of the solution, the extraction time and power. Not all the variables influence in the same way on the extraction recoveries. As a result of this, those variables that are not mutually influenced (their interaction is not statistically significant) were optimised sequentially. On the other hand, time and power are variables that are conditioned reciprocally; they were therefore studied using a factorial design.

To optimise the MAME procedure, we choose marine sediments from Taliarte harbour.

Surfactant volume

In some cases solvent volume may be an important parameter for efficient extractions. The solvent volume must be sufficient to ensure that the entire sample is immersed [34]. The surfactant volume-sample amount ratio was investigated by varying the volume of surfactant and keeping the sample mass constant. We studied four different ratios: 2 mL, 4 mL, 8 mL and 12 mL of surfactant solution and 2 g of sample. The results obtained for both surfactants showed that 2 mL is not enough to wet the sample; however, the recoveries achieved with the other solvent volumes were similar. Therefore, if the sample is full immersed in the solvent, an increase of the solvent volume does not seem to have any influence on the extraction percentages. We choose 4 mL of surfactant for subsequent studies.

Surfactant concentration

Four different concentrations for each surfactant, between 1 and 7.5% (v/v), were studied to establish the effect of this parameter on the extraction process. This initial study was carried out using a power of 200 W and a time of 2 minutes. Figure 1 shows the dependence of recoveries of two phenolic compounds, PH and 2,4-DCP, upon the surfactants concentration. A significant decrease on the recoveries was observed as the concentration of Genapol X-080 was increased from 3,0 to 7,5 % (v/v). It could be due to the fact that the solutions of this surfactant are more viscous than others at the same concentration so it will not contact the analytes as efficiently.

When we used Polidocanol as extractant, the recoveries increased slightly with an increase of the surfactant concentration. For this surfactant, the highest recovery percentages were obtained with 5% (v/v) surfactant. Over this concentration the recoveries remained constant or decreased slightly. A concentration of 2% (v/v) for Genapol X-080 and 5% (v/v) for Polidocanol were chosen to study the influence of microwave irradiation conditions, time and power, on the extraction process.

Solution pH

When working with sediment samples, the extraction process might also be influenced by the pH. The pH of the extracting solution can alter the ionic form of the analytes under study. To investigate the effect of this parameter on the process, samples containing 2 g of sediment in an acid and basic medium were subjected to MAME using the surfactant concentration, the power and time which was mentioned above. The results obtained, after analysing the extracted solutions, indicated that the basic medium slightly enhanced the extraction of some phenolic derivatives, such as phenol and 2-chlorophenol, while in the case of the most of them the pH solution had no effect on the recoveries. It was therefore decided not to modify the initial pH of the solution.

Optimisation of microwave irradiation conditions

In closed vessels system, the chosen power setting depends on the number of samples to be extracted during one extraction run. The power must be chosen correctly to avoid excessive temperatures, which could lead to analyte degradation and overpressure inside the vessels. This parameter is of prime importance in ensuring efficient extraction as it has to allow the diffusivity of the solvent into the internal parts of the matrix as well as enhanced desorption of the components from the active sites of the matrix.

As in other extraction techniques, time is another parameter whose influence needs to be taken into account. Extraction times in MAE are very short compared to conventional techniques; often 10 minutes are sufficient, but even 3 minutes have been demonstrated to give full recovery for pesticides from soils and sediments [35,36].

The irradiation power and the irradiation time of microwaves are two parameters that are interrelated, so their influence on the extraction were investigated using a factorial design. This model allows the direct evaluation of the variables considered. Moreover, the application of a statistical approach using a factorial design can both reduce the development time and provide less ambiguous data. We used a central composite design, 2^2 + star with three central points. The experimental design involving 11 runs, Table 2, was used as an approach to the response surface of the microwave extraction process [37]. Other variables involved in the extraction process were kept constant: surfactant concentration, 2% (v/v) for Genapol X-080 and 5% (v/v) for Polidocanol, surfactant volume, 4 mL, and sediment amount, 2 g. The concentration of phenolic compounds spiked was also kept constant: 2 µg/g.

Fig.2a shows the response surface for PH using Polidocanol as extractant. This extraction model shows an increase in the amount of analyte extracted with the microwave power. A maximum in the region of high powers and low times for the extraction can be observed. Fig.2b shows the response surface for PH using Genapol X-080. In this case, it can be observed that the higher recoveries are also obtained in the region of high powers and low times, decreasing gradually the extraction percentages at longer times. Response surfaces modelled for the other phenols lead to the same conclusions.

In accordance with these results, we therefore choose an irradiation power of 500 W and an extraction time of 2 minutes as the best irradiation conditions.

Liquid chromatographic analysis

The analysis of the extracted samples was carried out using high performance liquid chromatography with UV detection. The chromatogram obtained for the mixture of phenols

extracted of spiked sediment from Jandia Beach using Genapol X-080 as extractant is shown in Fig.3. The chromatogram obtained with Polidocanol is similar. It can be observed that this mobile phase allows a good separation of analytes, with both surfactants used, and a short analysis time.

The corresponding calibration curves in both surfactants were obtained by duplicate injection of the sample containing a surfactant concentration of 2% (v/v) of Polidocanol and Genapol X-080 and the corresponding analyte concentration. Concentrations ranged between 100 and 1500 μ g.L⁻¹. A linear relationship was obtained between peak areas and the analyte concentrations, with high correlation coefficients (0.995). The relative standard deviations were calculated for six samples, to which the MAME process was applied and are shown in Table 3, together with detection limit values. The results obtained indicate standard deviation values lower than 10 %. The detection limits [38] were calculated as twice the noise for each phenolic compound and vary between 2 and 20 μ g.L⁻¹ for all compounds studied.

Once the MAME conditions were optimised, the sediment was spiked with a standard certified mixture of the eleven phenols considered priority pollutants by the EPA. The extraction procedure was applied to test the validity of the proposed method. The results obtained are shown in Table 4, where we can observe the high degree of accordance with the certified values in the case of both studied surfactants. Only in the case of 2,4-DMP, the recoveries are lower but it is in line with the results obtained in other studies: the presence of methyl groups in the analyte inhibits the extraction [24].

Analytical Applications

Three different sediment samples from the Canary Islands coast were spiked with the mixture of fifteen phenols: Taliarte harbour, Las Canteras beach and Jandía beach. These samples have different characteristics: particle size, organic matter, carbonates amount and ferrous materials. The selected concentration level for spiking was the one typical of acute pollution events that may occur in industrial sites [39]. The sediments were spiked 24 h before extraction. Table 5 shows the recoveries obtained in the extraction of these compounds in the three types of sediments using Polidocanol and Genapol X-080. It can be observed that the

recoveries percentages, for the analytes under study, are better when we use Polidocanol as extractant. In the case of Taliarte sediment, some phenols, those which have methyl groups, have lower recoveries. This type of sediment has a lower particle size and a higher amount of organic matter. Electrostatic interactions can take place between the organic matter and the alkylphenols [24]. As a result of this, this type of analytes is more strongly retained in the sediment.

When we use Genapol X-080 to extract the phenolic compounds from the sediment, the recoveries obtained are lower than those achieved with Polidocanol. As we have explained above, this surfactant is more viscous than Polidocanol and it could not contact the analytes as efficiently. The values achieved for the sediment from Jandía beach are lower for most of the analytes studied. The main difference between this type of sediment and the others is a higher amount of carbonates and lower ferrous materials.

Decreasing recoveries resulting from aging of matrices is a well-known phenomenon [40]. The analytes present in the recent sediments are more easily extracted than those that have had a longer contact time. It can be explained according to whether the analytes are incorporated by adsorption (short periods) or by sequestration (longer periods) [41]. The former phenomenon is involved at the early stages of sorption, where H-bonding and Van der Waals forces prevail. On the other hand, sequestration involves sorption at remote microsites within the soil matrix [42].

In order to study the aging effects, we applied the MAME procedure to marine sediment (Taliarte harbour) three and six months after the samples were spiked. Fig. 4 shows the recoveries obtained for fresh and aged samples using Polidocanol as extractant. The results obtained show that the recoveries decrease as the time of contact between the matrices and the analytes increases, except for PCP. In this way, we can observe that for samples aged for three months, this decreasing is low (recoveries higher 70% are obtained for thirteen phenolic derivatives), whereas only ten compounds have recoveries above 50% in the case of six months. Although, in general, the recoveries obtained for aged samples are lower than those achieved

for fresh samples, the proposed method can be applied to detect the presence of this type of compound in marine sediments.

CONCLUSIONS

In this paper, the determination of phenolic compounds in marine sediments by MAME with HPLC and UV detection has been described . The optimal conditions have been established. As can be seen from the results, the applicability of the proposed method provides a viable alternative to other extraction techniques. The main advantages of MAME are shorter extraction times, higher sample throughput and organic-free solvents, which result in reduced cost and toxicity.

The methodology developed allows the simple, fast and selective determination of phenolic derivatives, including the eleven compounds considered priority pollutants by the EPA, in marine sediments.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was funded by the Spanish Ministry of Science and Technology Project N° PPQ2002/04683.

REFERENCES

- J.W. Patterson, Waste Water Treatment Technology, Ann Arbor Science, Ann Arbor, MI, 1975.
- R.L. Grob, (Editor), Chromatographic Analysis of the Environment, Marcel dekker, New York, NY, 2nd ed., 1983.
- 3. D. Puig, D. Barceló, Trends Anal. Chem., 15 (1996) 362.
- 4. M. Möder, S. Schrader, U. Franck, P. Popp, Fresenius J. Anal. Chem., 357 (1997) 326.
- 5. M.W. Powell, J. Chromatogr. A, 697 (1995) 101.
- 6. M.R. Lee, Y.C. Yeh, W.S. Hsiang, B.H. Hwan, J. Chromatogr. A, 806 (1998) 317.
- 7. L. Wennrich, P. Popp, M. Möder, Anal. Chem., 72 (2000) 546.
- 8. M. Ashraf-Khorassani, S. Gidanian, Y. Yamini, J. Chromatogr. Sci., 33 (1995) 658.

- P. Patnaik, A Comprenhensive guide to the Hazardous properties of Chemical Substances, Van Nostrand Reinhold, New York, NY, 1992.
- Environmental Protection Agency, Toxic Substance Control Act, US EPA, Washington, DC, 1979.
- 11. H.B. Lee, T.E. Peart, R.L. Hong-You, J. Chromatogr., 605 (1992) 109.
- 12. H.B. Lee, T.E. Peart, R.L. Hong-You, J. Chromatogr., 636 (1993) 263.
- J.J. Langenfeld, S.B. Hawthorne, D.J. Miller, J. Pawliszyn, Anal. Chem., 65 (1993) 338.
- C. Mahugo Santana, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodríguez, Analyst, 127 (2002) 1031.
- M. Ranil Criado, S. Pombo da Torre, S. Rodríguez Pereiro, R. Cela Torrijos, J. Chromatogr. A, 1024 (2004) 155.
- 16. A. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, J. Chromatogr. A, 953 (2002) 79.
- 17. M.N. Sarrión, F.J. Santos, M.T. Galceran, J. Chromatogr. A, 947 (2002) 155.
- 18. P. Barták, L. Cáp, J. Chromatogr. A, 767 (1997) 171
- 19. O.P.Heemken, T. Norbert, B.W. Wendawiak, Anal. Chem., 69 (1997) 2171.
- 20. J. Snyder, R. Grob, M. McNally, T. Oostdyk, Anal. Chem., 64 (1992) 1940.
- 21. V. Lopez-Avila, R. Young, N. Teplitsky, J. AOAC Int., 79 (1996) 142.
- 22. M., Letellier, H. Budzinski, Analyst, 124 (1999) 5.
- 23. M. Wei, J. Jen, J. Chromatogr. A, 1012 (2003) 111.
- 24. M.A. Crespín, M. Gallego, M. Varcárcel, J. Chromatogr. A, 897 (2000) 279.
- 25. R. Tukai, W.A. Maher, I.J. McNaught, M. J. Ellwood, Anal. Chim. Acta, 457 (2000) 173.
- V. Pino, J.H. Ayala, A.M. Afonso, V. González, Intern. J. Environ. Anal. Chem., 81 (2001) 281.
- 27. V. Pino, J.H. Ayala, A.M. Afonso, V. González, J. Chromatogr. A, 869 (2000) 515.
- A. Eiguren Fernández, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodríguez, Anal. Chim. Acta, 433 (2001) 237.
- 29. C. Padrón, A. Eiguren, Z. Sosa, J.J. Santana, J. AOAC Int., 85 (2002) 44.

- 30. A. B. Prevot, M. Gulmini, V. Zelano, E. Pramauro, Anal. Chem., 73 (2001) 3790.
- 31. M. P. Llompart, R.A. Lorenzo, R. Cela, J.R. Jocelyn Paré, Analyst, 122 (1997) 133.
- A. Eguizabal, O. Zuloaga, N. Etxevarría, L.A. Fernández, J.M. Madariaga, Analyst, 123 (1998) 1679.
- 33. C. Sparr Eskilsson, E. Björklund, J. Chromatogr. A, 902 (2000) 227.
- 34. I.J. Barnabas, J.R. Dean, I.A. Fowlis, S.P. Owen, Analyst, 120 (1995) 1897.
- 35. F.I. Omuska, K.A. Terry, Chromatographia, 36 (1993) 191.
- 36. G. Xiong, J. Liang, S. Zou, Z. Zhang, Anal. Chim. Acta, 371 (1998) 97.
- C. Montgomery, in: Design and analysis of Experiments, 3rd Edition, Wiley, New York, NY, 1991, Chapter 11.
- S. Lindsay, High Performance Liquid Chromatography, Wiley, New York, NY, 1992, 71.
- 39. N.M. Laine, H. Haario, K.S. Jorgensen, J. Microbial. Methods, 30 (1997) 21.
- 40. S.B. Hacothorne, E. Björklund, S. Bøwadt, L. Mathiasson, Environ. Sci. Technol., 33 (1999) 3251.
- 41. J. Dec, J. Bollag, Soil Sci., 162 (1997) 858.
- 42. F. Kopinke, J. Pörschmann, U. Stottmeister, Environ. Sci. Technol., 29 (1995) 941.

N°	Compound	Abbrevation	λ (nm)	t _R (min)
1	Phenol	РН	270	5.3
2	4-Nitrophenol	4 NP	315	8.7
3	2,4-Dinitrophenol	2,4-DNP	270	10.3
4	Para-Cresol	PC	280	11.9
5	2-Nitrophenol	2-NP	280	12.9
6	2-Chlorophenol	2-CP	280	14.0
7	4-Chlorophenol	4-CP	280	19.5
8	2,4-Dimethylphenol	2,4-DMP	280	24.7
9	4,6-Dinitro-ortho-Cresol	4,6-DNOC	270	25.3
10	4-Chloro-meta-Cresol	4-CMC	280	28.1
11	2,4,6-Trimethylphenol	2,4,6-TMP	280	29.1
12	2,4-Dichlorophenol	2,4-DCP	290	29.4
13	4-Chloro-3,5-Dimethylphenol	4-C-3,5-DMP	280	31.4
14	2,4,6-Trichlorophenol	2,4,6-TCP	290	33.0
15	Pentachlorophenol	PCP	303	38.2

.

Table 1.- List of phenolic derivatives, retention times and wavelenghts.

Run	Power (W)	Time (min)	
1	100	2 :	
2	100	8	
3	100	14	
4	300	2	
5	300	8	
6	300	8	
7	300	8	
8	300	14	
9	500	2	
10	500	8	
11	500	14	

.

•

Table 2.- Design matrix in the screening design.

	LOD (µg/L)		RSD ^a	RSD ^a (%)	
Compound	Polidocanol	Genapol X-080	Polidocanol	Genapol X-080	
РН	5	13	3,8	5,1	
4 NP	2	3	1,3	1,1	
2,4-DNP	3	3	2,0	2,9	
PC	10	11	9,9	9,6	
2-NP	3	4	4,6	5,0	
2-CP	9	10	9,5	7,9	
4-CP	12	17	2,7	4,8	
2,4-DMP	8	11	2,6	5,7	
4,6-DNOC	2	3	3,2	4,7	
4-CMC	5	16	4,1	3,9	
2,4,6-TMP	5	.15	9,1	9,5	
2,4-DCP	5	15	5,7	5,0	
4-C-3,5-DMP	6	19	5,6	4,3	
2,4,6-TCP	4	14	6,2	5,1	
PCP	10	20	5,8	5,0	

Table 3.-Analytical characteristics of the method.

^a RSD: Relative Standard Deviation (n = 6).

	Amount found (µg.g ⁻¹) ^b		
Compound	Polidocanol	Genapol X-080	
РН	2,18	1,95	
4 NP	2,07	2,01	
2,4-DNP	1,75	2,20	
2-NP	1,81	2,25	
2-CP	1,75	2,08	
2,4-DMP	1,20	1,03	
4,6-DNOC	1,76	2,03	
4-CMC	1,84	1,83	
2,4-DCP	1,90	1,80	
2,4,6-TCP	2,06	2,03	
РСР	1,92	1,76	

•

Table 4.- Determination of phenolic derivatives in sediment spiked with certified standard mixture^a.

^a Amound added of each analyte: 2 μg.g⁻¹. ^b Mean of three determinations.

.
			Recov	ery (%) ^b		
Compounds	Po	lidocanol		Ger	apol X-080)
	Las Canteras	Jandía	Taliarte	Las Canteras	Jandía	Taliarte
РН	111,1	101,9	100,2	86,0	73,0	78,1
4-NP	113,9	107,5	106,8	88,9	82,4	88,0
2,4-DNP	11 7,1	110,5	110,3	99,5	92,9	101,2
PC	101,3	98,1	90,7	85,6	71,3	88,6
2-NP	103,6	97,4	101,8	97,3	82,3	97,6
2-CP	88,9	89,7	95,8	94,2	67,1	93,4
4-CP	114,4	107,2	105,9	49,4	59,2	65,9
2,4-DMP	104,2	96,4	69,4	79,4	67,3	70,7
4,6-DNOC	114,9	107,8	107,8	97,0	83,7	98,7
4-CMC	107,4	99,6	101,3	92,2	71,1	85,7
2,4,6-TMP	79,4	82,1	14,9	75,7	58,3	23,7
2,4-DCP	117,4	99,3	103,3	83,3	64,8	87,7
4-C-3,5-DMP	100,7	90,7	95,2	82,0	61,3	78,6
2,4,6-TCP	108,3	100,6	107,3	97,0	86,4	101,1
РСР	94,9	97,9	97,9	71,1	58,3	99,4

Table 5.- Determination of phenolic derivatives mixture in different types of marine sediments^a.

^a Chromatographic conditions: water (with 1% acetic acid)-methanol (70:30) in 16 minutes (isocratic), up to 100 % methanol in 24 minutes; flow-rate 1mL.min⁻¹. Amount added of each analyte $2\mu g.g^{-1}$.

^bMean of three determinations.

FIGURE CAPTION

- Figure 1. Influence of the surfactant concentration (Genapol X-080, solid lines; Polidocanol, dashed lines) on the recovery percentages of some phenolic compounds.
- Figure 2. Response surface for Phenol, estimated by the central composite design. a) Polidocanol; b) Genapol X-080.
- Figure 3. Elution of a mixture of fithteen phenolic derivatives extracted of spiked sediment from Jandia Beach using Genapol X-080 as extractant. Chromatographic conditions as described in the text. The numbering refers to table 1.
- Figure 4. Recoveries of phenolic compounds from fresh and aged samples using Polidocanol.

٠











b)





AN ENVIROMENTALLY FRIENDLY METHOD FOR THE EXTRACTION AND DETERMINATION OF PRIORITY PHENOLS IN SOILS USING MICROWAVE ASSISTED MICELLAR EXTRACTION

C. MAHUGO SANTANA, Z. SOSA FERRERA Y J.J SANTANA RODRÍGUEZ ANALYTICAL CHEMISTRY ENVIADO PARA SU CONSIDERACIÓN (2004)

AN ENVIRONMENTALLY FRIENDLY METHOD FOR THE EXTRACTION AND DETERMINATION OF PRIORITY PHENOLS IN SOILS USING MICROWAVE ASSISTED MICELLAR EXTRACTION

Cristina Mahugo Santana, Zoraida Sosa Ferrera, José J. Santana Rodríguez* Department of Chemistry, Faculty of Marine Sciences, University of Las Palmas de Gran Canaria, 35017, Las Palmas de Gran Canaria, Spain

*Corresponding author: E-mail address: jsantana@dqui.ulpgc.es Phone: +34 928452915 Fax: + 34 928 452922



ABSTRACT

A non-ionic surfactant, Polyoxyethylene 10 Lauryl Ether (POLE), was used for the microwave-assisted extraction (MAE) of priority phenolic compounds from soil samples. A central composite design was applied to optimize the extraction parameters, that is to say, time and power. Under the optimized conditions, the method was applied to different soil samples in order to analyze the influence of soil characteristics on the phenol extraction. Results demonstrated that most of these compounds can be recovered in good yields (higher than 80 %) from the soils investigated. The standard deviation is lower than 9% (n= 6) for most analytes. Validation of the method by analyzing a reference soil sample containing 8 phenols and a comparison with Soxhlet extraction are also reported. *Keywords:* Phenols, Micellar medium, Extraction methods, Microwave, Soils, High Performance Liquid Chromatography.

INTRODUCTION

Phenolic compounds are prevalent in environmental waters and soils due to their widespread use in industrial processes.¹ These compounds are generated in the production of plastic, dyes, drugs, pesticides, antioxidants and paper, and in the petrochemical industry.² Pentachlorophenol (PCP) is used as a wood preservative.³ Furthermore, common pesticides, such as lindano and hexachlorobenzene, can be metabolized to PCP by plants, animals and microorganisms. Phenol is generated from lignin degradation in paper production⁴ and chlorophenols can be generated from phenols as the result of chlorinating drinking water. Nitrophenols are formed photochemically in the atmosphere from vehicle exhaust.⁵ As a result of years of use, these compounds have contaminated soils, surface waters, groundwaters and affected fish populations.

Phenolic compounds can cause toxicity, persistence and bioaccumulation effects in animal and vegetable organisms and may be dangerous for human health. Phenols have been included in the US Environmental Protection Agency (EPA) list of priority pollutants due to their toxicity.⁶ Furthermore, the European Union (EU) has classified several phenols as priority contaminants.⁷

Determination of phenols from contaminated soil is required to evaluate the extent of pollution and to apply the best soil remediation technology. The extraction step has so far been performed following the official methods issued by national and international environmental protection agencies, such as the EPA 3500 B and International Organization for Standardization (ISO) TC 190/SC3/WG6 methods. These require the use of relatively large volumes of organic solvents and there is therefore great concern regarding their negative environmental effects and their disposal. Moreover, the procedures involved in the extraction of phenols from soil samples (e.g. Soxhlet) are usually lengthy, non-selective and they entail a great deal of sample handling, which increases the risk of errors.^{8,9}

Recent concerns, about the hazardous nature and environmental dangers of organic solvents applied in environmental sample preparations, have led to the development of several extraction techniques that are free of organic solvents or only use low volumes of these solvents, such as solid phase microextraction (SPME), supercritical fluid extraction (SFE), subcritical water extraction (SBWE) and microwave-assisted extraction (MAE).¹⁰⁻¹⁴

The latter, MAE, which had been successfully applied to the extraction of organic compounds from soil, sediments, plants and animal tissues,¹⁵⁻¹⁸ needs less organic solvent and a shorter extraction time than traditional extraction methods. In general, the compounds can be extracted more selectively and more quickly with similar or better recoveries in comparison with conventional extraction processes.¹⁷

However, there are several disadvantages to using organic solvent for MAE. First, most organic solvents may be dangerous to the operators and may result in environmental pollution due to waste solvent disposal. Secondly, the organic solvent should generally be capable of absorbing the microwave energy. In some cases, a material must be added to absorb the energy and transfer it to the sample. This could mostly be achieved by adding water to the sample matrix.¹⁹ Moreover, organic solvent at a relatively high temperature and pressure may corrode the equipment.²⁰

The use of micellar system to substitute the organic solvents as extractant in MAE solves several problems caused by these solvents. Therefore, microwave-assisted extraction with micellar medium, MAME, seems to be a viable alternative to other extraction techniques. The main advantages are a shorter extraction time, a reduction in the amount of sample required for the analysis, higher sample throughput, less cost and great safety, as it does not require the use of hazardous organic solvents.

The aim of this study was to optimize the MAME process with the non-ionic surfactant polyoxyethylene 10 lauryl ether, POLE, by applying a central composite design and its application to the extraction of phenolic compounds. We studied the extraction of phenols from various types of soils with a view to analyzing the influence of soil organic matter and pH on the desorption of phenols. Fifteen phenolic compounds, including the priority, and three different types of soil were used.

EXPERIMENTAL

Reagents

Phenolic compounds were obtained from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) and prepared by dissolving appropriate amounts of the commercial products in methanol to obtain a concentration of 200 μ g.L⁻¹. Working solutions were prepared by further diluting these concentrations. The phenolic compounds are listed in Table 1 (numbers and abbreviations identify the compounds in figures). The

certified reference soil with phenolic compounds was obtained from Resource Technology Corporation (provided by LGC Promochem, Barcelona, Spain). The non-ionic surfactant used in this study, Polyoxyethylene 10 lauryl ether (POLE), was obtained from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) and prepared in deionized water. Methanol HPLC-grade was obtained from Panreac Química S.A. (Barcelona, Spain).

All the solvents and analytes were filtered through a 0.45 μ m nylon membrane filter and ultrahigh-quality water obtained from a water purification system was used throughout.

Apparatus

The chromatograph system consists of two Waters pump 510 fitted with a Waters Rheodyne 7725 i injector, with a 20 μ L sample loop and a Waters 996 Photodiode Array Detector. The system and the data management were controlled by Millenium software from Waters (Waters Cromatografia S.A. Barcelona, Spain). The stationary-phase column was a Waters Nova-Pack C18, 3.9 x 150 mm, 4 μ m particle diameter. The analytical column and the mobile phase reservoir were water-jacketed and thermostated at 25 ± 1° C with a circulating bath.

The microwave oven used in this study was a Multiwave (Anton Paar, Graz, Austria) with a 6 EVAP rotor and 6 MF100 vessels (Anton Paar, Graz, Austria).

Procedures

Soil characteristics

The soil samples were air-dried at room temperature for more than 2 weeks and sifted to a particle size of less than 0.3 mm. To determine the soil pH, 5 g of each soil was mixed with 20 mL of distilled water; the slurry was stirred and then allowed to separate before the surpernatant pH was measured potentiometrically. The organic matter content was determined by the Sauerlandt method (organic matter oxidation by potasic dichromate and sulphuric acid).

In order to study the influence of soil pH and organic matter in the extraction of phenols, three different soil samples were chosen from two gardens and a pine forest. Characteristics of the soils are given in Table 2.

Preparation of spiked soils

Phenols-free soil samples were collected from different locations on Gran Canaria (Canary Islands). After sieving, soil fractions with particle size under 0.3 mm were taken. These samples were air-dried at room temperature. These sediment samples were spiked as follows: to optimize the method, 2 g of each soil was spiked with a volume of a chlorophenol solution to obtain a concentration of each analyte at $2\mu g/g$. The same amount of soil was spiked with a solution of fifteen phenolic derivatives to obtain a final concentration of $4\mu g/g$ for analytical applications. The samples were then stored in the dark at room temperature for 24 hours before analysis.

The samples identified as "aged" samples were spiked with the mixture of phenolic derivatives to obtain a concentration of each analyte at $4\mu g/g$. The samples were stored in a refrigerator at 4°C for 1 week, 2 weeks, 4 weeks and 8 weeks. It was assumed that the phenols were uniformly distributed in the sample and that, as the sediment still retained residual moisture throughout the storage period, any analyte-matrix interactions would have occurred over the weathering period and to a similar extend to those in real contaminated sediments with similar properties.

Microwave assisted micellar extraction

Once the sediment sample was transferred to the vessel, 8 mL of the surfactant solution with a concentration of 5 % (v/v) were added and the sediment was subjected to the MAME process. The vessels were then allowed to cool down to room temperature, 10-15 minutes, before being opened. The extracted solution was filtered with a 0,45 μ m syringe-driven filter and transferred to a glass tube before injection.

Liquid chromatography analysis with UV detection

The analysis of the extracted samples was carried out using high performance liquid chromatography with UV detection. The separation and determination of the compounds under study were performed by injecting 20 μ L of extracts obtained into the liquid chromatograph and the absorbance for each analyte, corresponding to the wavelength maxima, was then measured. The retention time and the wavelength for each compound are listed in Table 1. The eluent used for the separation of the fifteen phenols mixture was water (with 1% acetic acid)-methanol (70:30) for 16

minutes (isocratic), up to 100 % methanol for 24 minutes. The eluent used for the separation of the eight chlorophenol mixture was methanol-water (40:60) up to 100 % methanol for 20 minutes. In both instances, the flow-rate was 1 ml.min⁻¹. The range of calibration curve concentration was between 100-2000 μ g.L⁻¹ and 100-1200 μ g.L⁻¹, respectively. These curves were obtained by duplicate injection of the solution containing 2% (v/v) Polyoxyethylene 10 lauryl ether, 5% (v/v) methanol and the corresponding analyte concentration. A linear relationship was obtained between peak areas and the analyte concentrations, with high correlation coefficients (0.995).

Soxhlet extraction

The fresh and aged samples were Soxhlet extracted during 16 h using 70 mL of acetonehexane (1:1). After the extraction step, the extract was evaporated to dryness using a rotary evaporator, dissolved in methanol and analysed by HPLC.

Statistical analysis

All statistical tests (ANOVA, experimental design) were performed using Statgraphics plus software, version 4.0 (Manugistic, Rockville, MD, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

Optimization of MAME methodology

Optimization experiments were performed using soil samples with an organic matter content of 4.8 % and a pH of 8.3 (Tafira soil) and a mixture of 8 chlorophenols.

Parameters that can influence the MAME process are pH, extractant volume and concentration, irradiation time and power and analyte concentration. Optimization of MAE conditions has been reported in several applications and many studies have used factorial, central composite and orthogonal array designs to find the optimal conditions.^{15, 21-25}

In previous studies carried out by our group, the surfactant concentration was optimized for polioxyethylen 10 lauryl ether, founding as optimum a concentration of 5 % (v/v). We used a central composite design to investigate the influence of irradiation time and power on the extraction process. Once these parameters were optimized, we studied the effect of the solution pH on the recovery using the optimal time and power.

We studied the influence of the volume surfactant solution on the extraction efficiency of phenols by varying the volume of surfactant and keeping the sample mass constant: 4 mL, 8mL and 12 mL of surfactant 5 % (v/v) and 2 g of sample were used. The results obtained, Table 3, show that 4 mL are not enough to wet the sample, but using a volume of 8 mL it is possible to wet the samples satisfactorily. When the volume of surfactant is higher, the temperature in the vessels also increased and the data obtained for phenol and 2-chlorophenol, using 12 mL surfactant, show that some solutes seem to degrade at high temperatures. We therefore chose 8 mL for the MAME optimization. Microwave irradiation conditions

The time and the power of irradiation are parameters that are interrelated, so their influence on the extraction efficiency was investigated by applying a statistical approach using a factorial design. It reduces the development time and provides less ambiguous data. We used a central composite design, 2^2 + star with three central points. The experimental design, involving 11 runs, was used as an approach to the response surface of the microwave extraction process. The experimental design parameters and the response values in the screening design are shown in Table 4. Other variables involved in the extraction process were kept constant: surfactant concentration, 5 % (v/v), surfactant volume, 8 mL, and soil sample amount, 2 g. The concentration of chlorophenols spiked was also kept constant, 2 µg/g.

The data analysis of the results given in Table 4 was performed using a regression analysis and the response surface (Y) was taken as a function of the considered variables (x_i) using polynomials. The general polynomial function is

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_1 x_2 + \beta_4 x_2^2 + \beta_5 x_2^2$$

where Y is the recovery, x_1 and x_2 are the variables considered in the optimization process and β_i are the parameters to be calculated.

Fig. 1a shows the response surface for 4-CMC. It can be observed that the amount of analyte extracted increases with the microwave power at short time intervals. This behavior is similar for the target compounds, except for PH (fig. 1b). The recoveries for this analyte increase with the power and time. However, these conditions increase the temperature inside the vessels and degradation of more

substituted analytes can occur, increasing the amount of phenol obtained. Therefore, a power level of 700 W and a time interval of 3 minutes were chosen for subsequence studies.

pH of solution

When working with soil samples, the extraction process might also be influenced by the pH of the extracting solution as it can alter the ionic form of the analytes under study. To investigate the effect of this parameter on the process, samples containing 2 g of soil in an acid and basic medium, by adding HCl or NaOH, were subjected to MAME using a surfactant concentration of 5 % (V/V) and the aforementioned power and time. The results obtained showed that there is no significant variation on the recoveries for most analytes under study. However, the more polar compounds, such as PH and 2-CP, show a slight increase in the recoveries when the pH was increased. This may be due to a basification of the extract producing phenolate ions which are non-volatile ^{26, 27} and losses of the most volatile compounds are this avoided. Despite this, we decided not to modify the pH solution as no significant changes were obtained.

Influence of analyte concentration

In order to determine the influence of analyte concentration on the extraction process, samples spiked with the mixture of chlorophenols in a range of concentration of 2-8 μ g/g were extracted using MAME. The values obtained demonstrate that this parameter has no influence on the extraction process for this range of concentrations.

Analytical Applications

Once the MAME conditions were optimized, the same soil used in the optimization procedure (Tafira soil) was spiked with a mixture of 15 phenolic derivatives to a final concentration of $4\mu g/g$. This new mixture contained the chlorophenols and 11 phenolic derivatives included in the EPA list of priority pollutants. These compounds behave differently to the chlorophenols, and therefore different interactions between matrix and analytes could occur. The values obtained show that the previously established conditions are adequate for most of the analytes studied, except for methylphenols, where the recoveries are lower (Table 5). Figure 2a shows the chromatogram obtained for an extract of 15 phenolic derivatives after MAME procedure. Figure 2b is the chromatogram of the non-spiked soil.

To determine the method accuracy and precision, six soil samples containing the 15 phenolic compounds were extracted simultaneously for 3 min and 700 W (optimal conditions), 24 hours after being spiked. The average recoveries and RSD for the 15 phenolic derivatives are shown in Table 5. It can be observed that the recovery values for most of the analytes extracted are higher than 80 %. The extraction yields for alkylphenols, PC, 2,4-DMP and 2,4,6-TMP, were very low, probably due to their interacting more strongly with the soil than is the case with the other phenols.²⁸ The other compounds present in the mixture with methyl groups behave more similarly to chlorophenols than to alkylphenols. The behavior of nitrophenols is similar to that of chlorophenols. The corresponding values of RSD are under 9 % for 13 of the 15 compounds studied.

Comparison of MAME with Soxhlet extraction

Soxhlet extractions were performed for comparison purposes. Figure 3 compares the recoveries values achieved with MAME and those obtained with Soxhlet extraction for Tafira soil. The results obtained with MAME are in line with the values obtained using Soxhlet extraction, except for 2,4,6-TMP and 2,4-DCP. The compounds eluted in the first 20 minutes can not be quantified due to the high amount of interferences in this part of the chromatogram.

Influence of matrix nature

In order to study the influence of soil characteristics on the extraction, we applied the MAME procedure to soils with different levels of organic matter, pH and texture. The effect of organic matter on phenols sorption was studied by using soil with the same pH and different content of organic matter (Tafira, 4.8 % and San Roque, 12.5%). Table 6 shows the recoveries obtained for these soil samples tested after 24 hours of conditioning. The results obtained with San Roque soil are better than those achieved using Tafira soil. The main difference is the good recoveries of alkylphenols in the soil with a higher content of organic matter. However, the mononitrophenols have recovery values slightly lower than 80 % in this type of soil.

The pH of soil can affect the sorption of phenols because the organic matter (in particular, the humic acids) behaves rather differently depending on this parameter, altering its sorbent capacity. The influence of soil pH on phenol extraction was studied using an acid soil (pine forest, pH 5.9) and an alkaline one (Tafira, pH 8.3). These soils have a similar content of organic matter, 4-5%. The results

obtained (Table 6) indicate that the recoveries of 13 phenols are higher than 80 % in the acid soil, while that the values obtained in the alkaline soil are slightly lower. Furthermore, the alkylphenols are extracted satisfactorily, but their recoveries are lower than those obtained in the samples that are high in organic matter.

The texture of a soil is extremely important in the sorption process. If a soil is mostly made up of clay and organic matter, a significant amount of sorption will take place. Clay, above all when intermixed with organic particles, is by far the most adsorbent of the three main soil textures (clay, silt and sand) due to its small particle size, high surface area, and high surface charge. Although the soils tested in this study are sandy ones, the Tafira soil has a higher amount of particles with a smaller size. Alkylphenols interacted more strongly with this kind of soil, which is probably due to this fact. It could explain the poor recoveries of these types of compounds in this soil. The results obtained indicate that for these soil types, with a high sand content, the soil texture is the parameter that has greater influence on the sorption process than the soil pH or organic matter content.

On the other hand, taking into account that the surfactants have a high capacity to extract humic and fulvic acids and that the phenols can be adsorbed into organic matter, this fact may explain the high recoveries of the compounds extracted from San Roque soil, with a higher organic matter content.

Influence of aging time

Decreasing recoveries resulting from aging of matrices is a well-known phenomenon.²⁹ The analytes present in recent soils samples are more easily extracted than those that have had a longer contact time. This can be explained according to whether the analytes are incorporated by adsorption (short periods) or by sequestration (longer periods).³⁰ The former phenomenon occurs at the early stages of sorption, where H-bonding and Van der Waals forces prevail. On the other hand, sequestration involves sorption at remote microsites within the soil matrix.³¹

In order to study the aging effects, we applied the MAME procedure to the three soils for different time periods after conditioning. The soil samples were spiked with the phenol mixture and stored at 4°C in dark before their extraction. Figures 4 (a,b and c) show the recoveries obtained for the

different groups of phenolic compounds in San Roque soil with the time aging. It can be seen that the recoveries decrease slightly during the two first weeks for the nitro and chlorophenols (fig.4a and 4b), but the amount of analyte extracted remains practically constant for these last compounds after this time. In the same figure, it can be observed that the recoveries of 2-nitrophenol, 4-nitrophenol and 2-chlorophenol increase slightly with time. This can be attribute to the fact that the more substituted analytes suffer microbial degradation and chemical transformation, such as losses of atoms of chloro or nitro groups, so they are converted into more simple compounds.

In figure 4c, it can be observed that the behavior of alkylphenols is quite different. In general, the recovery values decrease sharply with aging time up to one month. From then onwards, Paracresol increases its recovery as the aging time progresses, but we suspect that, as is the case of monochloro and mononitrophenols, this may be due to the degradation of other compounds with a greater number of substituents. As can be seen in the same figure, 4-C-3,5-DMP behaves in a more similar way to chlorophenols than to alkylphenols. The behavior of the analytes over time in the others soils tested is similar to that obtained for San Roque soil.

Comparison of MAME with Soxhlet extraction

To compare the extraction of aged samples, Soxhlet extractions were performed using 2 g of Tafira soil with 8 weeks of conditioning. Figure 5 shows the recoveries obtained with both the MAME and Soxhlet methods. It can be observed that, in general, the values obtained are quite similar, except for 2,4-DMP. Consequently, the MAME procedure is a viable alternative for the extraction of phenols from soil, not only in fresh samples, but in aged samples too.

Validation with a certified soil

Recoveries obtained with spiked compounds may not be representative of those obtained with native compounds. Spiked analytes are generally lightly coated on the surface of the matrix whereas native ones can be strongly adsorbed inside the porous matrix. This can be explained by the diffusional and the kinetic limitations of the sorption process, and the several interactions which may have been simultaneously established between native analyte and the matrix.³²⁻³⁴ This is the reason why it is necessary to validate the extraction procedure with certified reference matrices. For this purpose, we used a certified reference material with phenolic derivatives. The soil, sandy loam with ph 6.96, was

contaminated with phenols from a wood treating site in the Rocky Mountain region of the United States. The proposed extraction procedure was applied to 2 g of this soil using the optimal conditions. To check the presence of interfering species, the standard addition method was adopted to analyze the extracts. Table 7 reports the phenols present in the certified soil and gives the certificate values, the confidence intervals and the amounts of each analyte that we obtained using the MAME procedure. The recoveries obtained, falling within the certified range for all compounds analyzed, indicate that the proposed extraction procedure is suitable.

CONCLUSIONS

Nowadays, efforts are being directed towards the development of analytical techniques which rapidly achieve an accurate measurement of organic pollutants in environmental samples. According to the results obtained, the applicability of the proposed method provides a viable alternative to other extraction techniques. The main advantages of MAME are shorter extraction times, higher sample throughput and organic-free solvents, which result in reduced costs and environmental toxicity. The methodology developed allows the simple, fast and selective determination of phenolic derivatives, including the eleven compounds considered to be priority pollutants by the EPA, in soils samples.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was funded by the Spanish Ministry of Science and Technology Project N° PPQ2002/04683.



REFERENCES

- Moore, J.W., Ramamoorthy, S., Phenols in Organic Chemicals in Nature Waters. Applied Monitoring and Impact Assessment, Springer, New York, 1984.
- Martínez, D., Pocurull, E., Marcé, R.M., Borrull, F., Calull, M., J. Chromatogr. A, 1996, 734, 367-373.
- 3. Kontsas, H., Rosenberg, C., Pfäffli, P., Jäppinen, P., Analyst, 1995, 120, 1745-1749.
- 4. Mckague, A.B., J. Chromatog. A, 1981, 208, 287-293.
- 5. Tremp, J., Mattrel, P., Fingler, S., Water Air Soil Pollut., 1993, 68, 113-123.
- EPA Method 604 Phenols in Federal Register, Friday October 26, 1984, Environmental Protection Agency, Part VIII, 40 cFR Part 136, p. 58
- Drinking Water Directive 80/778/EEC, Commission of the European Communities, Brussels, 1980.
- 8. DiCorcia, J. Chromatogr., 1973, 80, 69-76
- 9. Hoshika, Y., J. Chromatogr., 1977, 144, 181-187.
- 10. Prosen, H., Zupancic-Kralj, Trends Anal. Chem., 1999, 18, 272-282.
- 11. Kawata, K., Ibaraki, T., Tanabe, A., Yagoh, H., Shinoda, A., Suzuki, H., Yasuhara, A., J. Chromatogr. A, 2001, 911, 75-83.
- 12. Li, B., Yang, Y., Eaton, C.D., He, P., Jones, A.D., J. Chromatogr. A, 2000, 873, 175-184.
- 13. Buchhloz, K.D., Pawliszyn, J., Anal. Chem., 1994, 66, 160-167.
- 14. Lopez-Avila, V., Young, R., Anal. Chem., 1994, 66, 1097-1106.
- 15. Llompart, M. P., Lorenzo, R.A., Cela, R., Jocelyn Paré, J.R., Analyst, 1997, 122, 133-137.
- 16. Lee, M.R., Yeh, Y. C., Hsiang, W. S., Hwang, B.H., J. Chromatogr. A, 1998, 806, 317-324.
- 17. Zlotorzynski, A, Rev. Anal. Chem., 1995, 25, 43-76.
- 18. Ho, W.H., Hsieh, S.J., Anal. Chim. Acta, 2001, 428, 111-120.
- 19. Jocelyn Paré, J.R., Belanger, M.R., Stafford, S.S., Trends Anal. Chem., 1994, 13, 176-184.
- 20. Xiong, G.H., Liang, J.M., Zou, S.C., Zhang, Z.X., Anal. Chim. Acta, 1998, 371, 97-103.
- Eguizabal, A. Zuloaga, O., Etxevarría, N., Fernández, L.A., Madariaga, J.M., Analyst, 1998, 123, 1679.

- Pino, V., Ayala, J.H., Afonso, A.M., González, V., Intern. J. Environ. Anal. Chem., 2001, 81, 281-294.
- 23. Pino, V., Ayala, J.H., Afonso, A.M., González, V., J. Chromatogr. A, 2000, 869, 515-522.
- Padrón Sanz, C., Eiguren Fernández, A., Sosa Ferrera, Z., Santana Rodríguez, J.J., J. AOAC Int., 2002, 85, 44-49.
- 25. Mahugo Santana, C., Sosa Ferrera, Z., Santana Rodríguez, J.J., *Anal. Chim. Acta*, **2004**, (article in press).
- 26. Galcerán, M.T., Jáuregui, O., Anal. Chim. Acta, 1995, 304, 75-84.
- 27. DiCorcia, A., Marchese, S., Samperi, R., JAOAC INT., 1994, 77, 446-453.
- 28. Crespín, M.A., Gallego, M., Varcárcel, M., J. Chromatogr. A, 2000, 897, 279-293.
- 29. Hacothorne, S.B., Björklund, E., Bøwadt, S., Mathiasson, L., *Environ. Sci. Technol.*, 1999, 33, 3152-3159.
- 30. Dec, J., Bollag, J., Soil Sci., 1997, 162, 858-874.
- 31. Kopinke, F., Pörschmann, J., Stottmeister, U., Environ. Sci. Technol., 1995, 29, 941-950.
- 32. Burford, M.D., Hawthorne, S.B., Miller, D.J., Anal. Chem., 1993, 65, 1497-1505.
- Richter, B.E., Jones, B.A., Ezzel, J.L., Porte, N.L., Avdanovic, N., Pohl, C., Anal. Chem., 1996, 68, 1033-1039.
- 34. Dupeyron, S., Dudermel, P.M., Counturier, D., Analusis, 1997, 25, 286-292.

				t _R (min)		
N°	Compound	Abbrevation	λ (nm)	Mobile phase	Mobile phase	
1	Phenol	РН	270	5.3	3.5	
2	4-Nitrophenol	4 NP	315	8.7	-	
3	2,4-Dinitrophenol	2,4-DNP	270	10.3	-	
4	Para-Cresol	PC	280	11.9	-	
5	2-Nitrophenol	2-NP	280	12.9	-	
6	2-Chlorophenol	2-CP	280	14.0	6.2	
7	4-Chlorophenol	4 - CP	280	19.5	7.5	
8	2,4-Dimethylphenol	2,4-DMP	280	24.7	-	
9	4,6-Dinitro-ortho-Cresol	4,6-DNOC ·	270	25.3	-	
10	4-Chloro-meta-Cresol	4-CMC	280	28.1	9.9	
11	2,4,6-Trimethylphenol	2,4,6-TMP	280	29.1	-	
12	2,4-Dichlorophenol	2,4-DCP	290	29.4	10.8	
13	4-Chloro-3,5-Dimethylphenol	4-C-3,5-DMP	280	31.4	12.1	
14	2,4,6-Trichlorophenol	2,4,6-TCP	290	33.0	13.5	
15	Pentachlorophenol	PCP	303	38.2	18.2	

Table 1.- List of phenolic derivatives, retention times and wavelenghts.

Soil	Particle size (%)					Organic matter	
	0.3 mm	0.2 mm	0.15mm	0.1 mm	рп	(%)	
Tafira	44.4	17.2	14.6	23.8	8.3	4.8	
San Roque	52.1	20.0	13.2	14.6	8.3	12.5	
Pine forest	56.5	17.8	12.8	12.8	5.9	3.9	

.

Table 2. Soil characteristics.

Compound	Sı	ırfactant volu	me
Compound _	4 mL	8 mL	12 mL
РН	80.4	116.8	150.2
2CP	89.9	92.1	102.3
4CP	41.1	98.3	102.0
4-CMC	47.2	92.5	117.6
2.4-DCP	65.6	82.7	90.2
4-C-3.5-DMF	60.5	76.2	95.3
2.4.6-TCP	70.0	87.7	81.2
РСР	73.9	112.0	113.9

•

.

Table 3. Recoveries (%)* obtained using different surfactant volumes.

* Mean of three determinations.

Des	ing	Recovery (%)*							
Power (W)	Time (min)	РН	2-CP	4-CP	4-CMC	2,4-DCP	4-C-3,5-DMP	2,4,6-TCP	РСР
300	3	75.5	81.4	35.9	84.1	92.3	82.1	99.0	117.4
300	9	69.8	85.1	29.9	78.7	88.5	78.1	92.8	113.2
300	15	66.2	81.5	20.3	74.7	87.1	80.8	96.2	109.4
500	3	65.4	87.3	18.9	81.2	93.8	84.4	100.0	, 115.1
500	9	63.8	78.5	20.3	75.0	86.5	74.2	94.3	108.0
500	15	64.7	62.2	24.1	76.4	85.4	75.5	94.2	110.7
700	3	87.3	86.7	62.9	107.2	97.5	103.3	105.7	116.6
700	9	90.7	84.7	79.5	96.4	98.6	97.6	107.0	115.0
700	15	91.8	86.6	76.6	96.9	98.0	94.8	101.4	110.2

Table 4. Design matrix and response values in the screening design.

* Mean of three determinations.

.

Compound	Recovery (%)	RSD (%)
РН	79.64	4.07
4 NP	92.07	2.23
2,4-DNP	106.03	2.51
PC	8.70	20.69
2-NP	80.61	1.50
2-CP	86.00	4.51
4-CP	61.90	8.11
2,4 - DMP	15.91	5.96
4,6-DNOC	97.90	1.89
4-CMC	88.01	2.65
2,4,6 - TMP	5.06	17.08
2,4 - DCP	98.87	4.56
4-C-3,5-DMP	95.08	4.26
2,4,6-TCP	91.85	1.35
РСР	105.13	3.98

•

.

Table 5. Average recoveries and relative standard deviations for studied phenols $\ensuremath{^{\ast}}$

* Mean of six extractions.

Compound	Pine forest	Tafira	San Roque
PH	80.6	79.6	83.1
4 NP	90.7	92.1	77.4
2,4 - DNP	103.4	106.0	104.2
PC	70.1	8.7	62.1
2-NP	82.1	80.6	61.8
2-CP	83.7	86.0	69.8
4-CP	79.0	61.9	80.6
2,4 - DMP	81.0	15.9	100.4
4,6-DNOC	99.9	97.9	101.9
4-CMC	91.4	88.0	104.1
2,4,6-TMP	61.3	5.1	114.7
2,4-DCP	88.1	98.9	108.9
4-C-3,5-DMP	89.6	95.1	100.3
2,4,6-TCP	81.9	91.9	94.5
РСР	98.5	105.1	117.9

.

.

Table 6. Recoveries (%)* of phenolic compounds obtained from different types of soil.

* Mean of three determinations.

Compound	Reference Value ^b	R.S.D.	Confidence Interval	Amound found
РН	2.45	1.63	1.35 - 3.55	1.19 ±0.026
4-NP	5.66	4.32	2.56 - 8.76	9.57 ± 0.003
2 - NP	4.33	2.75	2.40 - 6.27	2.34 ± 0.006
2 - CP	2.38	1.44	1.35 - 3.41	1.15 ± 0.019
4.6-DNOC	4.75	4.53	2.35 - 7.15	7.56 ± 0.007
4-CMC	4.94	2.80	3.04 - 6.84	2.64 ± 0.004
2.4 - DCP	2.53	1.11	1.69 - 3.37	3.21 ± 0.009
РСР	5.05	4.05	2.12 - 7.98	3.40 ± 0.006

Table 7. Extraction of phenolic compounds using MAME in a certified reference material^a.

^aAll values are expresed in mg/kg ^bThe phenol values in the sample were certified by USEPA SW846, 3rd edition analysis method 8041.

.

.

FIGURE CAPTIONS

- Figure 1. Response surface for the effect of time and power on the extraction of 4chlorometacresol (a) and phenol (b).
- Figure 2. Chromatogram of an extract of a spiked (a) and non spiked (b) sample soil after MAME procedure. Chromatographic conditions as described in the text. The numbering refers to table 1.
- Figure 3. Comparison of MAME with Soxhlet extraction technique for fresh sample soils (Tafira soil) after 24 hours of conditioning.
- Figure 4. Recoveries obtained after MAME procedure for the different groups of phenols against ageing time: Nitrophenols (a), Chlorophenols (b) and Alkylphenols (c).
- Figure 5. Comparison of MAME with Soxhlet extraction technique for aged soil (Tafira soil) after 8 weeks of conditioning.











.



Fig. 5



÷





Los fepoles y sus derivados has sido usados ampliamente en la lastria quámica y en apricultura. Debido a su texicidad, once derivados s han sido incluidos en la lista de contaminantes prioritarios por la EPA [1] Eatos companies estis presentes en el molio ambiente en hain chanes por lo que es acasenio incluir un paso previo de ido antes de su separación y destrutosción. En este trabaj da artiscantes no lónicos matilante la mundelogía denomia Cloud Point Entraction (CPB) [3,3]. Modiante cate proceso comp producentrar y extracr los smilitos en un insico paso. Esta metochología mento la ventaja de canyos seguridad, bajo enans y no tiese efectos tónicos ésido a la ténchegradabilistad de los estivacantes frente a los métodos más cionales de extractión basados en el uno de displyeones orgânicos. En caso catadas se ha otilizado la malindalogia CPE esanto el surfacante General X-000 para la descualmación de los femiles para famas en la tabla 1.

DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN AGUA USANDO UN SURFACTANTE NO IÓNICO PARA SU EXTRACCIÓN Y PRECONCENTRACIÓN PREVIA A SU DETECCIÓN MEDIANTE HPLC-UV

C. Mahugo Santana, Z. Sosa Ferrera y J.J. Santana Rodríguez

Departamento de Química, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, 35017 Las Palmas de Gran Canaria

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Optiolanción del proceso de extractión

* Afesta del tiempo de equilibración; La figura 2 maestra in dependencia del aje de extracción con el tiempo de españibración. Para los compuestos más polares, el porcentaje de analito extraido ammente hasas un máximo a los 20 minutos para laceso disaminato. Los compacados más hidrotóbicos prenestan un ligero assocido hasta los 20 uninatos, manuenidadoso el paracemple de councuidos prácticamente constanie a partir de este tieropo.

*Récio de la concentración de mafactimite: En la figura 3 se muestra la surinción del paracenteje de estimación con la concentración de Germpol X-080. En general, los paromitajes de recaporación camentan cuando euroentanos la concentración de cartactante, siendo el cambios mayor para los comparatos más noter-

Figure 2



#Hereto de la fuerno Iduica: La espuración de las dos fases se ve favorecido al afadir una sal interto ya que anmenta la densidad de la fase acuesa. Los compuestos manos polares son más inspinibles en la fate acusas camdo anmenta la emecanación de sul con lo que mejora su extracción. La fupora 4 muestra estas variaciones.



INTRODUCCIÓN

Apendos

Sistema HPLC:hombus Waters (models 310), inyextor Blandyne (models 7725) y colomna Novo-Pack C.g. 33× 150 mm do Silanetra do particula 4 jun de Waters.
Octorior: Fatallado Army Waters (modelo 996).
Contrifuge (models Mixiad) y boto ferransalización (modelo Textro 280), ambos de Selectu.

Provilated

* Expandide y presencestración: los melitos, en presencia del surfaceme y NeCl, se memorieron en un baño urazonisico a ana temperatura de 85°C duante 20 minutos, se modifição el pH de la disolución atachendo un 1% de ácido acítico. La asperación de las feses se efectad contrilingundo a 3900 rpm chemme 5 minutos. Pare la descruchención del porcentaje de exitacción, despada do la unción de las fasta, se afadió 0.5 ml. de metarrol y agus hasta el volumen ínicial. Para obtener un factor de preconcentración de los analitate de cieco veces, después de la separación de las fases se atadió 0.25 ml. de matanol y agua hasta un volumen final de 2 ml. * Condiciones crumatograficas: la fase mévil militade fue agua (1% de ácido acético) : metanoli, los primeros 16 minutos en una propartido 70:30 y hasta un 100 % de metanol en los signientes 24 minutos. Phylo: 1 ml/min. En la figura 1 se maestes el crumatourana obtenido.

able 1 Derivados fer





Parámetros analíticas

Una yeu optimicado de indexión e malicamo las compondientes contras de calibradore es en majo de concessoradanes, coste (107 yeu) organi. Las entracionas de calibradores de calibradores en en majo de concessoradanes, coste (107 yeu) estadores de calibradores de calibradores en esta yeu yeu esta de calibradores de cal

		Agua	de mer	Aguad	aguarada
	Computer	% Recuperación (100 ng.mL ⁻¹)	% Recoperación (300 ng.mL ⁻¹)	% Recuperación (100 mm.mL ⁻¹)	% Recuperación (300 ng.mL*)
a la contra de la co	PH	69	67	100000 St 100 pt	61
plicado a la dese unhación de una mencia	4-NP	15	12	70	77
dos tipos de imentras de acuas, anna	2.4-DNP	71	37	36	66
1 or mentation memory on to table 1	70	6)	Rt	64	63
and the set of the second set of the second a	2-MP	73	76	63	64
ruha aron canadana ar	202	74	19	70	70
	23-060	27	84	74	84
	4.4-DHOC	94	98	82	\$7
	4-CMC	99	109	92	102
	24.6-TMP	54	79	str	0
	2.4-DCP	97	105	301	103
	ACALSTINP	105	100	104	92
	24.6-102	107	111	191	107
	2210	110	107	104	103

REFERENCIAS

Aplicaciones

El prouzeo for conceda y agua de z

1. J.E. Langbottom and J.J. Licharaburg, Method for Organic Counteral Analysis of Alunicipal and Industrial Wastewater, US EPA, EPA-6004-82-037, Method 604, (1982)

W.L. Hinzo and H. Pransmon, Crit. Rev. Anal. Chem.; 24 (1993) 133
T. Sainob and W.L. Hinze, Talance, 42(1) (1995) 119

COMPARATIVE STUDY OF THE EXTRACTION AND PRECONCENTRATION OF PHENOLIC COMPOUNDS IN WATER USING TWO NON-IONIC SURFACTANTS PRIOR TO THEIR HPLC-UV DETECTION

C. Mahugo Santana, Z. Sasa Ferrera, J.J. Santana Redriguez • Department of Chemistry, Faculty of Marine Science, University of Las Palmas de Gran Canaria, 35017, Las Palmas de Gran Canaria, Spain,

INTRODUCTION

Due to their towicity the ent in low

In this work, we set out th hard CPI g them by high-pe thodology has be ne 10 Lanary 1 ehter) and POLIDOCANOL (Poly POLE ene 9 Lauryl We use ty This CPE The compounds are listed in Table I

EXPERIMENTAL

id.4mp Ch OGS P

d for d A for POLE

*Lian

Fig. 1

RESULTS AND DISCUSSION

a de enelle ER

Fig. 2 shows the de es), the Fig 3 shows the office of in d There on is greater when the

Table 1. * Compound Phoned Abrevation Planol 4-nitrephenol 2,4-disirrophe Partervaol 2-nitrophenal ANP ADN PC I-NP 2-chlorophenol 2,4-dimethyiphea 4,6-diaitroorthoo 4-chloromotacida 2,4-dichlorophea 4-chlorophea 2,4,6-tichloropha 2,4,6-tichloropha 8 9, 10, 11, 12, 13, 14, 4-CMC



*Effent of the Ismin strength

The persons of solution en for a Net.1





APPLICATION OF MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION USING MICELLAR MEDIA TO THE DETERMINATION OF PHENOLS IN MARINE SEDIMENTS

C. Mahugo Santana, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodriguez.*

Department of Chemistry, Faculty of Marine Sciences, University of Las Palmas de Gran Canaria. 35017. Las Palmas de Gran Canaria, Spain, E-mail: isantana@dqui.ulpoc.es

Phenols, especially chlorophenols, have a highly toxic character and it is well known that these substances exhibit properties that are hazardous to human health [1].

In this work, a new methodology, the microwave assisted micellar extraction (MAME), has been employed to extract a mixture of phenols (Table 1) from marine sediments using the non-ionic surfactant Polidocanol (Polyoxyethylene 9 Lauryl Ether). This method reduces considerably the volume of extractant used and the total analysis time [2].

	lable
N	Compound
1.	Phenol
2	2-chlorophenol
3.	4-chiorophenol
4.	4-chiorometacresoi
5.	2,4-dichlorophenol
6.	4-chloro-3,5-methylpher
7.	2,4,6-trichlorophenol
8.	Pentachiorophenol

10, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006



Apparatus Microware system: Multiware with a rotor 6EVAP and 6 MF-100 vessels (Anton Paar, Graz, Austria). Chromatoghaphy system: Waters pumps 510, Waters injector model Rheodyne 77251 and a column. Waters Nova-Pack C.,, 3.9 x 150 mm i.d. 4 m particle diameter. Waters 996 Photodiode Array Detector.

Procedure

Extraction: sediment samples containing the phenols mixture, were introduced in the microware system. with the corresponding salt and surfactant concentration. After the irradiation, the surfactant extract,

previously filtered, was directly injected in to the chromatographic system. Liquid chromatography analysis: elution was carried out using a gradient 60:40, water (containing 1% acetic acid): methanol, up to 100% methanol in 20 minutes. Flow-rate 1 ml.min. Fig. 1 shows the cromatogram obtained

Optimisation of the extraction process




USE OF POLYOXYETHYLENE 6 LAURYL ETHER AND MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION TO THE DETERMINATION OF **CHLOROPHENOLS IN MARINE SEDIMENTS**

Cristina Mahugo¹, Zoraida Sosa¹, José J. Santana¹ ¹ Department of Chemistry, Faculty of Marine Sciences, University of Las Palmas de Gran Canaria, 35017, Las Palmas de Gran Canaria, Spain



Research Proyect No: PI2000/045 and Spanish Ministry of Science and Technology Project No PPO2002/04683.



USE OF POLYOXYETHYLENE 10 LAURYL ETHER ON THE EXTRACTION AND DETERMINATION OF PHENOLIC **COMPOUNDS IN MARINE SEDIMENTS**

Cristina Mahugo¹, Zoraida Sosa¹, José J. Santana¹ ¹Department of Chemistry, Faculty of Marine Sciences, University of Las Palmas de Gran Canaria, 35017, Las

Palmas de Gran Canaria, Spain



References • V. Camel, Trends in Ana.I Chem., 2000, 19, (4), 229. • A. Eiguren, Z. Sosa and J.J. Santana, Chromatog., 2001, 53, 375.

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF PRIORITY PHENOLS IN MARINE SEDIMENTS AFTER MICROWAVE ASSISTED MICELLAR EXTRACTION

Cristina Mahugo Santana, Zoraida Sosa Ferrera, José J. Santana, Rodriguez Department of Chemistry, Faculty of Marine Sciences. University of Las Palmas de Gran Canaria, 35017, Las Palmas de Gran Canaria, Spain, e-mail: jsantana@dau.ubgc.es

Introduction

Experimental

In this work a new extraction method has been optimised. The microwave-assisted micellar extraction (MAME) (1,2) was applied to the extraction of fifteen phenolic compounds in marine sediment samples from coastal areas of Canaria Islands, using the non ionic surfactant Genapol X-OSO as extractant. The effect of experimental parameters (surfactant concentration, pH, extraction time and power) on the extraction efficiency was studied.

MAME process scheme

2 g of dry sediment was spiked with the phenolic derivatives (final concentration of 2 mg/Kg). 4 mL aqueous micellar solution of Genapol X-080 was added to the sediments

The spiked samples were allowed to dry for 24 h. The aged samples were spiked in the same way and stored in a refrigerator for 6 months

Influence of different variables on the extraction

The effect of surfactant concentration on extraction was studied by varying the concentration of Genapol X-080 between 1 and 7.5% (v/v). Figure shows the effect of increasing the concentration of surfactant on the percentage extraction of analytes.



Optimum conditions Genapol X-080: 2% (v/v) Time: 2 min. Power: 500 W

The optimum time and microwave power were obtained by a central composite design, 2^2 + star with three central points. The experimental design involves 11 runs.



Response surface for the effect of these parameters on the extraction of 2-Chlorophenol. The best recoveries are obtained when applying the maximum power at any radiation time or the highest time at any radiation power.

References

4-CMC 2,4,6-TCP

2 4 6 Instant concentration % (V/V)

 1
 V. Camel. Trends in Ana I Chem., 2000, 19, (4), 229

 2
 A. Eiguren, Z. Sosa and J.J. Santana, Chromatog., 2001, 53, 375.

Acknowledgments

This work was supported by funds provided by Spanish Ministry of Science and Technology Project N^{0} PPQ2002/04683

Chromatogram of the extract from one sediment sample containing the mixture of phenolic derivatives.

2.1-dimethylpheno

9 4.6-dinitroorthophenol

11. Z.4.6-trimethylphene

13. 4-chloro-3,5-dimethylj

Chromatographic conditions: water (1% acetic acid): methanol. Gradient elution 70:30 in 16 min. (isocratic), up to 100 % methanol in 24 min. Flow-rate: 1 ml/min.

14. 2,4,6-trichlorophenol

10. 4-chlorometacresol

12. 2.4-dichlorophenol

4-11P

PC

Z-NP

2-CF

4-CP

4-nitrophenol

2,4-dinitrophen

2-chiorophenol

4-chlorophenol

Paracresol 2-nitrophenol 2.4-DM

4.6-DNOC 4-CMC 2,4.6-TMP

2.+-DCP

1-C-3,5-DMP

2,4,6-TCP

seament sample containing the mixture of phenolic derivatives.

Recoveries of the phenolic derivatives extracted from two different sediment samples and from an aged sediment sample under the optimum conditions.



