

Tesis Doctoral

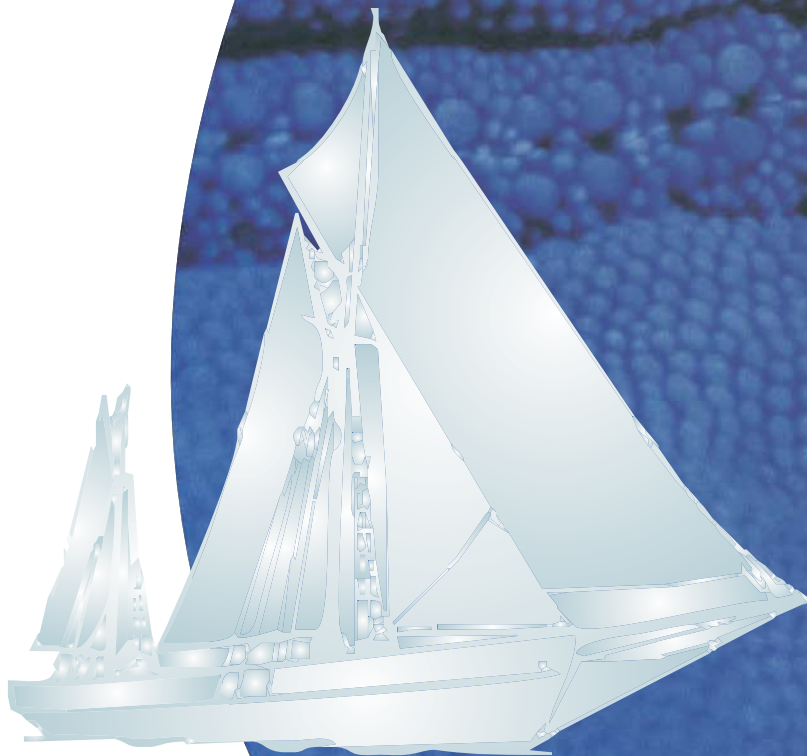
**Evaluación de los niveles de  
biocidas antiincrustantes en  
puertos y marinas de la isla de  
Gran Canaria.  
Distribución espacial y temporal.**

2010

Tesis Doctoral

Álvaro Sánchez Rodríguez

Álvaro Sánchez Rodríguez  
Las Palmas de Gran Canaria 2010





UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA  
Departamento de Química

D<sup>a</sup> ZORAIDA SOSA FERRERA, SECRETARIA DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA,

CERTIFICA:

Que el Consejo de Doctores del Departamento en su sesión de fecha 10 de mayo de 2010 tomó el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación, a la Tesis Doctoral titulada "EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE BIOCIDAS ANTIINCRUSTANTES EN PUERTOS Y MARINAS DE LA ISLA DE GRAN CANARIA. DISTRIBUCIÓN ESPACIAL Y TEMPORAL.", presentada por el doctorando D. Álvaro Sánchez Rodríguez y dirigida por el Dr. D. José Juan Santana Rodríguez y por la Dra. Dña. Zoraida Sosa Ferrera.

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Artº 73.2 del Reglamento de Estudios de Doctorado de esta Universidad, firmo el presente en Las Palmas de Gran Canaria, a 10 de Mayo de 2010.

Fdo.: Zoraida Sosa Ferrera



Programa de Doctorado en Oceanografía.

Bienio 2005-2007 (Mención de Calidad de la ANECA). Departamento de  
Química.

Título de la Tesis: "EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE BIOCIDAS  
ANTIINCRUSTANTES EN PUERTOS Y MARINAS DE LA ISLA DE GRAN CANARIA.  
DISTRIBUCIÓN ESPACIAL Y TEMPORAL."

Memoria presentada por D. Álvaro Sánchez Rodríguez para optar al grado  
de Doctor por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria y dirigida por  
el Dr. D. José Juan Santana Rodríguez, Catedrático de Universidad del área de  
Química Analítica y por la Dra. Dña. Zoraida Sosa Ferrera, Titular de Universidad  
del área de Química Analítica.

Los Directores

El Doctorando

Las Palmas de Gran Canaria, a 5 de Mayo de 2010



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA  
Departamento de Química

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

HACE CONSTAR:

Que la presente memoria titulada "EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE BIOCIDAS ANTIINCRUSTANTES EN PUERTOS Y MARINAS DE LA ISLA DE GRAN CANARIA. DISTRIBUCIÓN ESPACIAL Y TEMPORAL.", que presenta el doctorando D. Álvaro Sánchez Rodríguez para optar al grado de Doctor por esta Universidad, ha sido realizada en los laboratorios del Departamento de Química de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Tras su registro y trámite autorizados por el Departamento, autorizo con esta fecha su presentación.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente en Las Palmas de Gran Canaria, a 5 de Mayo de 2010.

Fdo.: Miguel Ángel Suárez de Tangil

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA  
Departamento de Química

TESIS DOCTORAL

**Evaluación de los niveles de biocidas  
antiincrustantes en puertos y marinas de la  
isla de Gran Canaria.**

**Distribución espacial y temporal.**

Álvaro Sánchez Rodríguez

LAS PALMAS DE GRAN CANARIA  
ESPAÑA

2010

## *Agradecimientos*

*El trabajo llevado a cabo durante estos cuatro años me ha ayudado a crecer tanto a nivel profesional como humano, aprendiendo a valorar el esfuerzo y saborear los frutos del mismo. Son muchas las personas que han aportado su grano de arena para que esta memoria sea una realidad, a todos ellos, gracias:*

*A mi madre, por todo el apoyo y entrega durante tantos años, hay cosas que nunca se agradecen lo suficiente. A mi padre por ver siempre el vaso medio lleno y por transmitirme una visión del mundo basada en el humor, que me ayuda a ser un poco más feliz. A mi abuelo por su agudo ingenio en la construcción de diversos utensilios y sobre todo por ser un ejemplo de esfuerzo y superación. A mi hermano, a Jana, al pequeño Joel, a mis tíos y en general a toda mi familia que siempre me ha apoyado en cualquier empresa.*

*A mis directores, el Dr. José Juan Santana Rodríguez y la Dra. Zoraida Sosa Ferrera por darme esta oportunidad única y por poner al alcance de mi mano todo su conocimiento y medios posibles, haciéndome crecer día a día. A José Juan por creer en mis posibilidades más de lo que lo podría haber hecho yo mismo, por introducirme en un mundo que me apasiona y por aportar de forma continua ilusión y apoyo. A Zoraida por tener una visión práctica y realista, además de múltiples respuestas y alternativas a cualquier situación que pudiera surgir, por guiarme y por evitar que me perdiera en la inmensidad.*

*A mis compañeros de laboratorio; a Miriam Torres por su predisposición continua a ayudar, a Cristina Mahugo por representar la voz de la experiencia,*

*a Daura Vega por acompañarme a dar esos primeros pasos que tanto cuestan; a Tana y Sarah por compartir tantas tardes y tantas risas; a Borja, a Miguel, a Rubén, a Carolina... Mención especial a Sarah por el buen cumplimiento de sus tareas como recadera (¡lo prometido es deuda!).*

*Al Dr. Ángelo Santana del Pino por su ayuda inestimable en el tratamiento de datos y por su predisposición a la hora de compartir su valioso conocimiento sin esperar nada a cambio.*

*A todo el Departamento de Química por estar siempre dispuestos a echar una mano y por hacerme sentir dentro de una gran familia. A los miembros del PAS y a toda la Facultad de Ciencias del Mar por compartir junto a mí, día a día, más de un tercio de mi vida.*

*A todos los miembros del Departamento de Agua del Instituto Tecnológico de Canarias por el apoyo recibido en estos últimos meses y por enseñarme a valorar el trabajo que hay detrás de esta memoria.*

*A todos mis amigos, los de siempre y aquellos que he conocido por el camino, por su apoyo, ánimo y preocupación, pero sobre todo por inundar de risas y alegría mi vida. Me siento afortunado de tenerles a mi lado. Mención especial a "Ale" por la lectura comprensiva y a Aarón por compartir cada día estos últimos diez años, la próxima Tesis Doctoral es la tuya!!.*

*A la Autoridad del Puerto de Las Palmas de Gran Canaria por facilitarnos la toma de muestras y por poner a nuestra disposición una embarcación para la recolección de las mismas. Al Real Club Náutico de Gran Canaria, al Club Varadero de Las Palmas de Gran Canaria y a las Autoridades Portuarias de Mogán y Puerto Rico por facilitarnos en todo momento el acceso a sus instalaciones y por mostrar interés por nuestro trabajo.*

*Al Ministerio de Ciencia e Innovación por la beca FPU (AP2006-02996) y por el proyecto del Plan Nacional de I+D+i CTM2006/06503 que han aportado los fondos necesarios para esta investigación, y al Cabildo de Gran Canaria por la beca de investigación de postgrado en temas de interés para la isla de Gran Canaria.*





*Playa de Mogán (mayo 2007)*

## Índice general

<b>I</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>1</b>	<b>Compuestos antiincrustantes</b>	<b>5</b>
1.1	Pasado y presente . . . . .	5
	La bioincrustación . . . . .	5
	Sistemas antiincrustantes . . . . .	7
1.2	<i>Booster biocides</i> en el medio marino . . . . .	17
	Niveles, comportamiento y toxicidad . . . . .	19
1.3	Evaluación del riesgo ecológico . . . . .	31
<b>2</b>	<b>Técnicas de extracción y determinación</b>	<b>35</b>
2.1	Extracción de muestras líquidas . . . . .	35
	Extracción en fase sólida (SPE) . . . . .	36
2.2	Extracción de muestras sólidas . . . . .	41
	Extracción asistida por microondas (MAE) . . . . .	42
2.3	Determinación . . . . .	46
<b>3</b>	<b>Objetivos</b>	<b>49</b>

<b>II</b>	<b>EXPERIMENTAL</b>	<b>53</b>
<b>4</b>	<b>Aparatos y reactivos</b>	<b>55</b>
4.1	Aparatos utilizados . . . . .	55
	HPLC-DAD . . . . .	55
	LC-MS/MS . . . . .	56
	Microondas . . . . .	57
	Sistema de SPE . . . . .	58
4.2	Reactivos y disoluciones . . . . .	58
	Reactivos . . . . .	58
	Extracción en fase sólida . . . . .	59
	Disoluciones . . . . .	59
<b>5</b>	<b>Muestreo</b>	<b>61</b>
5.1	Descripción y localización de los puertos objeto de estudio . . . . .	64
	Puerto de Las Palmas de Gran Canaria . . . . .	64
	Puerto deportivo del Real Club Náutico de Gran Canaria . . . . .	66
	Puerto deportivo de Las Palmas de Gran Canaria . . . . .	66
	Puerto de Mogán . . . . .	67
	Puerto deportivo de Puerto Rico . . . . .	68
	Puerto pesquero de Arguineguín . . . . .	69
5.2	Toma y conservación de muestras . . . . .	69
	Muestras de agua de mar . . . . .	69
	Muestras de sedimentos . . . . .	70
<b>6</b>	<b>Procedimientos analíticos</b>	<b>73</b>
6.1	Análisis cromatográfico por HPLC-DAD . . . . .	73

6.2	Análisis cromatográfico por LC-ESI-MS/MS . . . . .	74
6.3	Acondicionamiento de muestras . . . . .	75
	Muestras de agua de mar . . . . .	75
	Muestras de sedimentos . . . . .	76
6.4	Extracción en fase sólida de muestras de agua de mar . . . . .	76
6.5	Extracción asistida por microondas de sedimentos . . . . .	77
6.6	Extracción líquido-líquido . . . . .	77
6.7	Determinación del contenido de materia orgánica . . . . .	78
<b>7</b>	<b>Tratamiento de datos</b>	<b>81</b>
7.1	Análisis estadístico . . . . .	81
	Diseño factorial . . . . .	81
	Análisis de resultados en muestras reales . . . . .	82
7.2	Evaluación probabilística del riesgo ecológico . . . . .	83
<b>III</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>91</b>
<b>III.1</b>	<b>AGUAS</b>	<b>93</b>
<b>8</b>	<b>Optimización de la extracción de biocidas en muestras de agua de mar mediante SPE</b>	<b>95</b>
8.1	Variables en estudio . . . . .	96
	Tipo de fase sólida . . . . .	96
	Lavado . . . . .	98
	Volumen de elución . . . . .	100
	Volumen de muestra . . . . .	102

8.2	Parámetros analíticos y validación . . . . .	103
	Análisis cromatográfico mediante HPLC-DAD . . . . .	103
	Parámetros analíticos . . . . .	104
	Validación . . . . .	106
8.3	Determinación mediante LC-MS/MS . . . . .	108
	Optimización . . . . .	109
	Parámetros analíticos . . . . .	112
<b>9</b>	<b>Determinación de biocidas en muestras de agua de mar</b>	<b>115</b>
9.1	Análisis mediante HPLC-DAD . . . . .	116
9.2	Análisis mediante LC-MS/MS . . . . .	123
9.3	Evaluación probabilística del riesgo ecológico . . . . .	134
<b>III.II</b>	<b>SEDIMENTOS</b>	<b>147</b>
<b>10</b>	<b>Optimización de la extracción de biocidas en sedimentos mediante</b>	
	<b>MAE-SPE</b>	<b>149</b>
10.1	Ensayos preliminares . . . . .	150
	Elección del disolvente de extracción . . . . .	150
	Dilución del extracto . . . . .	152
10.2	Optimización de variables en la extracción MAE . . . . .	154
	Factores principales . . . . .	154
	Potencia y tiempo de extracción . . . . .	156
10.3	Parámetros analíticos . . . . .	157
	Análisis cromatográfico . . . . .	157
	Parámetros analíticos obtenidos mediante MAE-SPE-LC-MS/MS .	159

11 Determinación de biocidas en muestras de sedimentos	161
<b>IV CONCLUSIONES</b>	<b>169</b>
<b>V REFERENCIAS</b>	<b>175</b>
Índice de tablas	202
Índice de figuras	204
Acrónimos	209
<b>ANEXOS</b>	<b>213</b>
<b>A Niveles de biocidas en muestras de agua de mar y sedimentos</b>	<b>215</b>
<b>B Difusión científica</b>	<b>231</b>
B.1 Publicaciones . . . . .	231
B.2 Comunicaciones a congresos . . . . .	232

# *I. INTRODUCCIÓN*

---

# Capítulo 1

## *Compuestos antiincrustantes*

### 1.1. Pasado y presente

#### La bioincrustación

El término bioincrustación o incrustación biológica (*biofouling*) hace referencia a una agregación de organismos sobre cualquier objeto presente en medio acuoso, se podría definir como una acumulación indeseable de microorganismos, plantas y animales sobre superficies sumergidas (figura 1.1). Esta aglomeración no sólo aparece en buques y barcos, sino que también es un problema frecuente en conducciones de agua y otros dispositivos inmersos, como jaulas destinadas a la piscicultura. La aparición de las bioincrustaciones acarrea una serie de consecuencias negativas tanto a nivel económico como ecológico [1], siendo las más importantes:

- ⇒ El aumento de la rugosidad de la superficie y por lo tanto de la fricción, con la consecuente pérdida de maniobrabilidad y aumento del consumo de



combustible (hasta un 40 % más [2]).

- ⇒ La necesidad de varar los barcos para la limpieza del casco, generando gran cantidad de desechos tóxicos en el proceso.
- ⇒ El deterioro de las superficies aumentando el proceso de corrosión química.
- ⇒ La introducción de especies foráneas [3, 4].



**Figura 1.1** .- Casco de un barco afectado por bioincrustaciones (extraído de la referencia [1]).

Dentro de las incrustaciones biológicas nos encontramos con microincrustaciones y macroincrustaciones. Las microincrustaciones están constituidas por bacterias, protozoos, diatomeas y esporas de macroalgas, mientras que en las macroincrustaciones están constituidas por larvas de diferentes organismos, crustáceos, briozoos, moluscos, tunicados, etc. [5]. La aparición de la incrustación biológica ha sido estudiada en detalle, conociéndose todas las etapas por la que transcurre una superficie afectada [6]. En cada una de estas etapas aparecen diferentes capas que sirven para la posterior agregación de

## 1. Compuestos antiincrustantes

---

la siguiente, en la cual predominan organismos de mayor tamaño (ver tabla 1.1).

Tabla 1.1.- Etapas de la incrustación biológica.

<i>Etapa</i>	<i>Proceso</i>	<i>Incrustación</i>	<i>Comienzo</i>
1	Adhesión de moléculas orgánicas como proteínas, polisacáridos, etc.	Película orgánica	1 minuto
2	Aparición de bacterias como <i>Pseudomonas putrefaciens</i> y <i>Vibrio alginofyticos</i> y de diatomeas como <i>Achnantes brevipes</i> , <i>Licmophora abbreviata</i> , etc.	Microincrustación, colonizadores primarios	1-24 horas
3	Aparición de esporas de macroalgas como <i>Enteromorpha intestinalis</i> y protozoos como <i>Zoolhamnium</i> sp.	Microincrustación, colonizadores secundarios	1 semana
4	Aparición de larvas de organismos de mayor tamaño como moluscos, crustáceos, etc.	Macroincrustación, colonizadores terciarios	2-3 semanas

### Sistemas antiincrustantes

Para evitar la aparición de las bioincrustaciones, desde los comienzos de la navegación se han optado por diferentes estrategias, siendo las más comunes las basadas en la liberación de compuestos tóxicos al medio circundante. Ya en el año 700 a.C., los fenicios y cartagineses empleaban revestimientos de cobre y posteriormente de plomo además de arsénico y azufre mezclados con aceite [7]. Se sabe que los griegos y romanos adoptaron medidas similares en sus flotas, pero

no fue hasta mediados del siglo XIX cuando aparecieron las primeras pinturas antiincrustantes, éstas mostraron una alta eficacia y eficiencia, por lo que, desde entonces, se instauraron en el mercado como la medida más efectiva para atajar el problema. Las primeras pinturas contenían como sustancia activa cobre, arsénico o mercurio mezclado con linaza o resina [6].

Ya a partir de la segunda mitad del siglo XX se comenzó a fabricar y distribuir de forma masiva las pinturas antiincrustantes basadas en la solución de metales como plomo y arsénico, compuestos orgánicos de mercurio o pesticidas como el DDT [8], junto a diferentes matrices que determinaban la tasa de liberación al medio así como la efectividad y duración de las mismas. Basándonos en como se distribuya el compuesto activo en la matriz nos encontrarnos con [9]:

- ① pinturas en la que el biocida se encuentra disuelto en su seno, donde la liberación del mismo al medio no está controlada. Se produce una gran liberación del compuesto en un primer momento para después ir perdiendo eficacia de forma exponencial con el tiempo.
- ② pinturas en las que el biocida está unido químicamente a un polímero insoluble en agua de mar y que en contacto con ésta se libera. Estas pinturas muestran una mayor eficiencia debido a la liberación controlada del compuesto activo.

En la actualidad numerosas investigaciones se centran en buscar alternativas reales al uso de pinturas con alto contenido en biocidas. Entre las diferentes opciones que se barajan cabe destacar la introducción de compuestos antiincrustantes naturales producidos por diversos organismos marinos [10, 11] como corales, esponjas o cetáceos, la utilización de diversos productos como las

## 1. Compuestos antiincrustantes

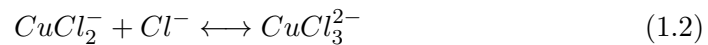
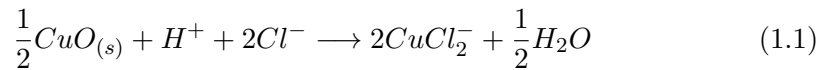
---

siliconas que se liberan con el movimiento del barco o el empleo de recubrimientos electroconductivos [12].

### Biocidas utilizados

#### *Óxidos Metálicos*

Los metales pesados son uno de los principales biocidas empleados en este tipo de pinturas, siendo muy frecuente el empleo de pigmentos de cobre. El proceso por el cual este metal se libera en el medio marino es el siguiente [13]:



En donde la reacción 1.1 es irreversible, mientras que la reacción 1.2 es instantánea y reversible, encontrándose en permanente equilibrio, ya que el agua de mar suele ser un medio oxigenado y los complejos de cobre son rápidamente oxidados a  $Cu^{2+}$ , que es la forma tóxica.

Los óxidos de cobre no son efectivos para todos los organismos acuáticos, su toxicidad decrece en el siguiente orden: microorganismos, invertebrados, algas, bivalvos y macrófitos [14]. Por otro lado, en el medio se encuentran numerosos ligandos que complejan al cobre y evitan que se encuentre disponible, algunos de estos ligandos son excretados por los mismos organismos como medida preventiva [14]. También se ha empleado óxidos de otros metales como zinc(II), Fe(III) y Titanio (IV) [6].

### *Compuestos organoestánicos*

Numerosos compuestos organometálicos han sido estudiados y empleados en las pinturas antiincrustantes. Entre ellos, cabe destacar los compuestos que son formulados en función de una estructura del tipo  $RMeX$ , donde R corresponde al radical orgánico, Me al metal y X a un haluro. Así se han utilizado en épocas pasadas compuestos orgánicos de plomo, mercurio y arsénico, aunque debido a sus propiedades fisicoquímicas, los compuestos orgánicos de estaño han dominado el mercado, teniendo además otras muchas aplicaciones.

Aproximadamente el 70 % de la producción de compuestos organoestánicos es destinada a su uso como estabilizador del PVC, mientras que el 20 % se destina a su uso como biocida en el tratamiento de maderas, la agricultura, etc. Se calcula que al año se han podido estar destinando unas 3500 toneladas de compuestos organoestánicos para su uso en pinturas antiincrustantes (tributylestaño y trifenylestaño fundamentalmente) [15].

Desde el punto de vista histórico, el desarrollo de las pinturas antiincrustantes basadas en compuestos de estaño ha estado condicionado por dos importantes avances: el primero es el descubrimiento del tributylestaño (TBT), mostrando desde un principio una gran eficacia como compuesto antiincrustante y una baja toxicidad para mamíferos, empezándose con su comercialización a principios de los años sesenta, y el segundo es el empleo del mismo en conjunción con diversos polímeros que controlan la tasa de liberación y prologan la vida útil de las pinturas [16].

Los polímeros como el metacrilato unidos al TBT reaccionan en contacto con el agua de mar, liberándose éste de su estructura a una tasa constante, mientras se erosiona la superficie del barco [17].

## 1. Compuestos antiincrustantes

---

La reducción en el consumo de combustible y en la frecuencia de los varamientos ahorró a la industria naval a mediados de los años noventa 5.7 billones de dólares por año [18], por lo que no es de extrañar que este tipo de pinturas se extendieran rápidamente y fueran aplicadas a más del 70 % de la flota mundial.

Lamentablemente, el TBT mostró consecuencias desastrosas para especies marinas no objetivo. En 1974 se había descrito a lo largo de la costa Este de Inglaterra un crecimiento anormal de las valvas en los cultivos de ostras (*Crassostrea gigas*), pero no fue hasta la década de los ochenta cuando los investigadores empezaron a relacionar estos hechos con el uso del TBT [16]. Los efectos catastróficos del TBT sobre especies no objetivo se hicieron por primera vez palpables en la bahía de Arcachon en Francia, una bahía cerrada y comunicada con mar abierto por un estrecho canal, en la cual anualmente se producían de 10 000 a 15 000 toneladas de ostra, además de albergar una intensa actividad náutica (sobre 7 800 atraques). Se empezaron a observar calcificaciones anómalas y una menor capacidad de reproducción de las ostras que acarrió numerosas pérdidas económicas [19]. Aunque el TBT se mostró aún más tóxico en gasterópodos, provocando en los individuos femeninos uno de sus efectos adversos más conocidos, el *Imposex*<sup>1</sup>. En la tabla 1.2, se muestran los valores de NOEC<sup>2</sup> descritos para distintos organismos marinos [19], como se puede apreciar los efectos nocivos del TBT son palpables a concentraciones de ng/L o incluso inferiores, siendo los moluscos los más sensibles a su presencia.

Desde que se describieron los efectos nocivos de los compuestos organoestánicos en el medio marino, han sido frecuentes los estudios que

---

<sup>1</sup>Superposición de los conductos deferentes y genitales masculinos sobre los femeninos impidiendo la reproducción [20].

<sup>2</sup>Concentración máxima de efectos no observados.

**Tabla 1.2 .-** Niveles de TBT de efectos no observados (NOEC) sobre especies no objetivo.

<i>NOEC</i>	<i>Efectos</i>
< 1ng/L	<i>Imposex</i> en gasterópodos.
1 ng/L	Disminución del crecimiento del fitoplancton y zooplancton.
< 2 ng/L	Anomalías de calcificación en ostras ( <i>C. gigas</i> ).
20 ng/L	Disminución de la reproducción en <i>C. gigas</i> .
1-10 µg/L	Disminución de la reproducción en peces.
1-100 µg/L	Comportamiento anómalo en peces.
<500 µg/L	Efectos sobre la ecdisis <sup>a</sup> en crustáceos.

<sup>a</sup>Muda del exoesqueleto.

determinan la concentración de los mismos en agua, sedimentos y biota. Estos compuestos muestran una gran afinidad por el material particulado, eliminándose fundamentalmente de la columna de agua por la adsorción sobre el mismo [21], aunque diversas actividades como el dragado o incluso fenómenos meteorológicos como las tormentas pueden provocar su movilización [22].

La vida media del TBT en aguas de puerto y de estuario oscila entre días y semanas [23], encontrándose el proceso de descomposición influenciado por la actividad biológica, actividad química y por la irradiación ultravioleta [9]; pero en sedimentos la degradación es mucho más lenta, con una vida media que, según diversos autores, es de varios años [24, 25].

La contaminación por TBT se ha convertido en un problema global encontrándose trazas de este compuesto en muy diversos ecosistemas como por ejemplo la gran barrera de coral australiana o en la Antártida [26]; además su carácter lipofílico hace que se bioacumule y se biomagnifique a través de la cadena

## 1. Compuestos antiincrustantes

---

trófica, hallándose en altas concentraciones en aquellos organismos que representan el último eslabón de la misma, como por ejemplo los cetáceos [27], además de otros organismos característicos de ecosistemas menos accesibles como el océano profundo [28].

No es de extrañar que, con todas las consecuencias medioambientales descritas, diversas administraciones comenzaran, desde la década de los 80, a restringir el uso de los compuestos organoestánicos como agentes antiincrustantes a pesar de su elevada eficacia.

El 5 de octubre de 2001, la Organización Marítima Internacional (IMO), dependiente de la Organización de Naciones Unidas (ONU), adoptó el convenio internacional para el control de sistemas antiincrustantes perjudiciales (*AFS Convention*), por el cual se estableció que:

- ⇨ A 1 de enero de 2003 se prohibiría la aplicación de pinturas antiincrustantes basadas en compuestos organoestánicos.
- ⇨ A 1 de enero de 2008 se prohibiría portar dichas pinturas en los cascos de los barcos.

Este convenio entró en vigor el 17 de septiembre de 2008, además la comisión para la protección del medio marino (MPEC) también propuso que la IMO promoviera el uso de tecnologías medioambientalmente no agresivas para sustituir al TBT.

Sin embargo hay tres hechos que cuestionan estas medidas: la primera es el coste que supone la conversión hacia pinturas libres de organoestánicos, la segunda es si dichas pinturas muestran una alta actividad antiincrustante sin acarrear problemas medioambientales [29] y la tercera es que, si bien, mediante la prohibición en barcos de menos de 25 m se ha observado una disminución



importante de estos compuestos en el medio [16], en buques de mayor eslora acarrea consecuencias negativas desde el punto de vista económico.

La sustitución de los compuestos organoestánicos en las pinturas antiincrustantes crea controversia y las alternativas introducidas al respecto se basan también en la utilización de compuestos que, como se comenta posteriormente, han demostrado ser tóxicos para especies no objetivo.

***Booster biocides***

A partir de que se comenzó a restringir el uso de los compuestos organoestánicos, los productores de pinturas empezaron a emplear el cobre como principal agente antiincrustante, siendo el cobre metálico, el óxido de cobre (I) ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ) y tiocianato de cobre ( $\text{CuSCN}$ ) las formas de presentación más frecuentes. Sin embargo, este metal no se muestra tóxico para todo el espectro de organismos incrustantes; ciertas algas manifiestan una alta tolerancia al mismo y por lo tanto es necesario utilizar otros compuestos para mejorar la eficacia de las pinturas antiincrustantes libres de estaño [30]. Estos compuestos son conocidos como *booster biocides*, y en el pasado, alguno de ellos fue también utilizado en pinturas organoestánicas [14]. En la tabla 1.3 se mencionan diversos compuestos que han sido destinados para tal fin.

**Tabla 1.3** .- Algunos de los *booster biocides* más utilizados.

<i>Compuesto</i>	<i>Nº CAS<sup>a</sup></i>
<i>4-Cloro-meta-cresol</i>	59-50-7
<i>Clorotalonil</i>	1897-45-6
<i>Dicloftuanid</i>	1085-98-9
<i>Diurón</i>	330-54-1

## 1. Compuestos antiincrustantes

---

Continuación

<i>Compuesto</i>	<i>Nº CAS<sup>a</sup></i>
<i>Folpet</i>	133-07-3
<i>Irgarol 1051</i>	28159-98-0
<i>IT-354</i>	13167-25-4
<i>Maneb</i>	12427-38-2
<i>SeaNine 211</i>	64359-81-5
<i>TCMS piridina</i>	13108-52-6
<i>TCMTB</i>	21564-17-0
<i>Tiram</i>	137-26-8
<i>Tolifluanida</i>	731-27-1
<i>TPBP</i>	971-66-4
<i>Piritiona de zinc</i>	13463-41-7
<i>Zineb</i>	12122-67-7
<i>Ziram</i>	137-30-4

---

<sup>a</sup> *Chemical Abstract Service.*

La mayoría de estos biocidas son ya conocidos y utilizados como pesticidas en otras áreas como la agricultura o la industria, pero hasta hace aproximadamente diez años había un total desconocimiento sobre los riesgos y efectos de su empleo en el medio marino [31]. Este hecho hizo que se promovieran proyectos conducentes hacia su estudio en el nuevo medio. Un claro ejemplo es el proyecto "*Assessment of Antifouling Agents in Coastal Environments*" (ACE) subvencionado por la Comunidad Europea y en el cual se pretendía: establecer metodologías analíticas para la determinación de estos compuestos en muestras marinas, realizar campañas

de muestreo en diferentes áreas de la comunidad, suministrar datos sobre transporte, ecotoxicología y degradación a través de ensayos de laboratorio, realizar modelos predictivos, conocer su impacto sobre el medio, etc. [32].

Desgraciadamente algunos de estos compuestos han mostrado efectos tóxicos sobre especies no objetivo, encontrándose ya regulados en ciertos países como por ejemplo Suecia, Dinamarca o Reino Unido [33]. Incluso el Diurón, uno de los más empleados, aparece dentro de la lista de sustancias prioritarias en el Ámbito de la Política de Aguas de la Directiva Europea 2000/60/CE [34].

La determinación de varios de estos biocidas antiincrustantes en muestras marinas es el tema sobre el que versa la presente Tesis Doctoral. En la tabla 1.4 se citan aquellos que han sido seleccionados para la presente investigación, y en la figura 1.2 se pueden observar sus estructuras químicas.

Tabla 1.4 .- Compuestos antiincrustantes objeto de estudio.

<i>Nombre comercial</i>	<i>IUPAC</i>
<i>Tiram</i>	1-(dimetiltiocarbamoildisulfanil)-N,N-dimetilmetanotioamida
<i>4-Cloro-meta-cresol</i>	4-cloro-3-metil-fenol
<i>Diurón</i>	3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetil-urea
<i>TCMTB (Busan)</i>	2-(tiocianatomethilsulfanil)benzotiazol
<i>Clorotalonil</i>	2,4,5,6-tetraclorobenceno-1,3-dicarbonitrilo
<i>Diclofluanid</i>	1,1-dicloro-N-(dimetilsulfamoil)-1-fluoro-N-fenil-metanosulfonamida
<i>Irgarol 1051</i>	N <sup>1</sup> -ciclopropil-6-metilsulfanil-N-tert-butil-1,3,5-triazina-2,4-diamina

## 1. Compuestos antiincrustantes

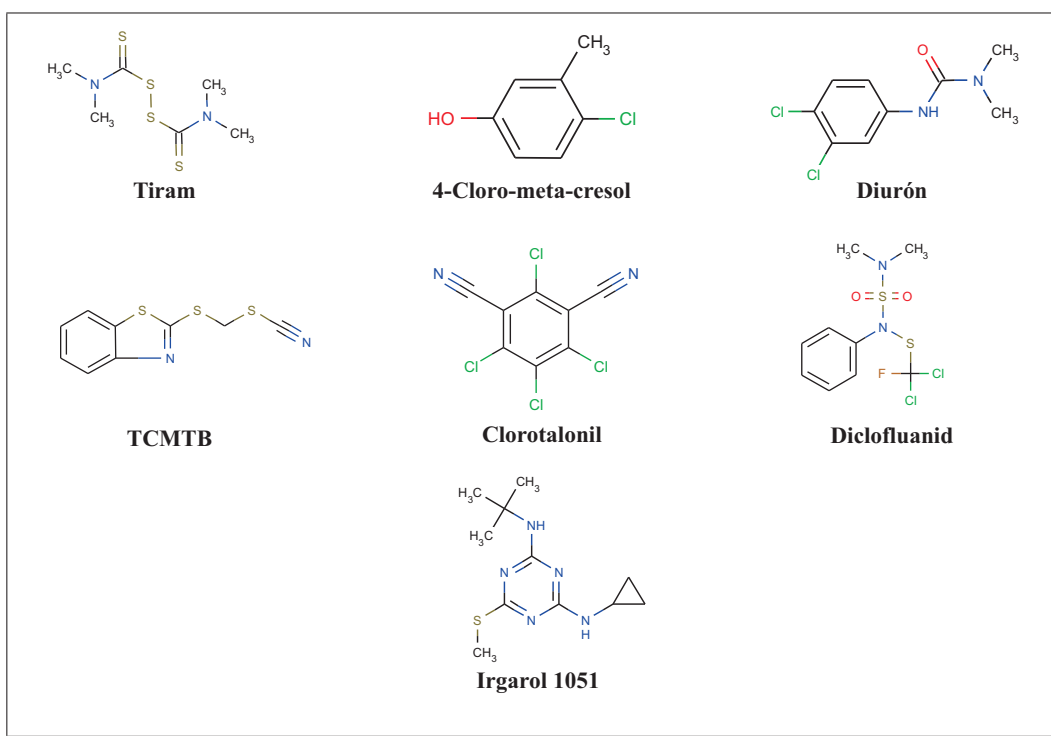


Figura 1.2 .- Compuestos antiincrustantes objeto de estudio.

### 1.2. *Booster biocides* en el medio marino

Como se comentó anteriormente, existe una gran variedad de compuestos empleados en las pinturas navales junto al cobre, no existiendo entre ellos similitudes estructurales. La mayoría han sido y son empleados en otros ámbitos muy alejados de las pinturas navales (tabla 1.5), aunque bien es cierto que algún compuesto como el Sea-nine 211 (tabla 1.3) es utilizado sólo para este fin. Todos los usos adicionales que se hacen de estos compuestos provocan que, en determinadas áreas costeras como los estuarios, las concentraciones halladas de los mismos puedan ser consecuencia de la conjunción de diferentes fuentes. En el caso del

## 1.2. *Booster biocidas* en el medio marino

---

Clorotalonil se ha observado que la escorrentía procedente de las áreas agrícolas aporta grandes cantidades de este compuesto al medio marino [35].

Tabla 1.5 .- Diferentes usos de los compuestos en de estudio (ver referencias [14,36]).

<i>Biocida</i>	<i>Otras aplicaciones</i>
<i>Tiram</i>	Fungicida en agricultura y conservación de hojas y semillas.
<i>4-Cloro-meta-cresol</i>	Biocida en medicina y cosmética, empleo en pegamentos, alimentación y en la industria textil.
<i>Diurón</i>	Herbicida en agricultura.
<i>TCMTB</i>	Fungicida en agricultura, conservante en maderas y empleo en la industria del cuero.
<i>Clorotalonil</i>	Fungicida en agricultura y empleo en pinturas y adhesivos.
<i>Dicloftuanid</i>	Fungicida en agricultura.
<i>Irgarol 1051</i>	Herbicida en agricultura.

Antes de que estos compuestos se encuentren libres en el medio, deben lixiviarse de la superficie donde se encuentran retenidos, haciéndolo a una determinada velocidad conocida como tasa de liberación. Existen varios protocolos estandarizados (ASTM<sup>3</sup> D5108-80 e ISO<sup>4</sup>/DIS 1518-1,2) donde se mide en laboratorio bajo condiciones controladas, la tasa de liberación del ingrediente activo expresado como  $\mu gcm^2d^{-1}$ . Los resultados obtenidos para varios compuestos mediante el protocolo ISO y estudios en canal pueden observarse en la tabla 1.6. Los estudios realizados en canal han mostrado que los cambios en

---

<sup>3</sup>American Society of Testing Materials.

<sup>4</sup>International Standard Organization.

## 1. Compuestos antiincrustantes

---

temperatura, salinidad, concentración de material particulado y velocidad del buque no tienen efectos apreciables sobre las tasas de liberación, aunque, por otro lado, se ha observado que cambios a largo plazo en temperatura y salinidad aumentan de forma apreciable la tasa de liberación del Irgarol 1051 [37].

Tabla 1.6 .- Tasas de liberación (ver referencia [37]).

<i>Biocida</i>	<i>Tasas de liberación (<math>\mu\text{gcm}^2\text{d}^{-1}</math>)</i>	
	<i>Test ISO</i>	<i>Ensayos en canal</i>
<i>Diurón</i>	3.3	0.8
<i>TCMTB</i>	-	0.9
<i>Diclofluanid</i>	0.6	1.7
<i>Irgarol 1051</i>	5.0	2.6

La gran variabilidad estructural de estos compuestos hace que las propiedades físico-químicas de los mismos sean muy diversas, algunas de las cuáles pueden observarse en la tabla 1.7. Por otro lado, en el medio marino van a estar sujetos a toda una serie de procesos, como la adsorción sobre el material particulado, degradación biológica, fotólisis, etc. (figura 1.3), que van a condicionar los niveles presentes y por lo tanto su incidencia sobre especies no objetivo.

### Niveles, comportamiento y toxicidad

#### Irgarol 1051

Este biocida es uno de los agentes antiincrustantes más documentado, habiéndose encontrado en muestras procedentes de todo el mundo. Se ha hallado en diversos países de Europa, así como Japón, EEUU y Australia entre otros. Las

## 1.2. Booster biocidas en el medio marino

Tabla 1.7 .- Propiedades fisico-químicas de los compuestos objeto de estudio.

Compuesto	Presión de vapor (Pa)	Solubilidad en agua ( $\text{g}/\text{m}^3$ )	$\log K_{ow}$	Temperatura de fusión ( $^{\circ}\text{C}$ )	Cita
Tiram	$2.3 \times 10^{-3}$	$1.8 \times 10^1$	1.73	156	[38,39]
4-Cloro-meta-cresol	6.6	$4 \times 10^3$	2.63	66	[36,40]
Diurón	$4.1 \times 10^{-4}$	$3.64 \times 10^1$	2.85	159	[16]
TCMTB	1	$3.3 \times 10^{-4}$	3.30	$< -10$	[16]
Clorotalonil	$1.3 \times 10^{-3}$	$6 \times 10^{-1}$	2.64	159	[16]
Diclofluanid	$1.33 \times 10^{-4}$	$6 \times 10^{-3}$	3.70	106	[16]
Irgarol 1051	$1.5 \times 10^{-5}$	7	2.38	130	[41]

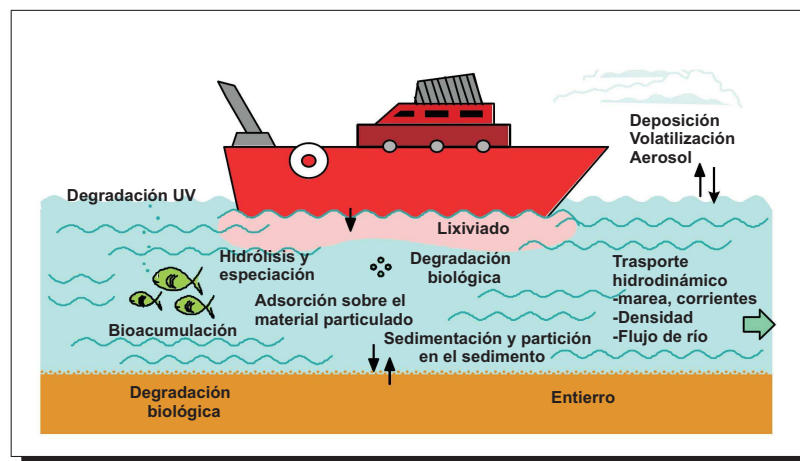


Figura 1.3 .- Procesos que afectan a los biocidas antiincrustantes en el medio marino (adaptado de la referencia [42]).

primeras referencias acerca de su presencia en aguas costeras datan del año 1993 en Francia (Côte d'Azur) donde se llegó a determinar niveles de hasta 1700 ng/L [43].

## 1. Compuestos antiincrustantes

---

El mecanismo de acción del Irgarol 1051 sobre organismos fotosintéticos es similar al resto de triazinas empleadas como herbicidas, básicamente bloquea el transporte de electrones al nivel del fotosistema II inhibiendo la captación de CO<sub>2</sub> y por lo tanto la producción de hidratos de carbono. Una característica de las triazinas es que su acción tóxica es reversible, restaurándose la actividad fotosintética cuando desaparece la exposición a dichos compuestos [41]. Diversos estudios han observado que este compuesto muestra una elevada toxicidad para especies autótrofas, concentraciones de 136 ng/L (IC50<sup>5</sup>) causan daños importantes sobre especies como la diatomea de agua dulce *Navicula pelliculosa*, mientras que niveles de 63 ng/L provocan una disminución de la actividad fotosintética en comunidades de fitoplanctónicas [44]. En cuanto a los macrófitos, concentraciones similares ya provocan efectos observables, a 180 ng/L se ve afectada la eficiencia fotosintética de especies clave como la fanerógama *Zostera marina* [45]. En invertebrados la toxicidad que presenta este compuesto es mucho menor, por ejemplo el valor LC50<sup>6</sup> para *Mysidopsis bahia* es de  $4.3 \times 10^5$  ng/L [46].

El Irgarol 1051 se muestra bastante estable en el medio acuoso [47] con un tiempo de vida media en agua de mar que ronda los centenares de días [37, 41, 48]. Por otro lado se considera que es poco biodegradable [49]. Diversos estudios han sido realizados en este sentido, determinando que, después de un tiempo prolongado de incubación, no se observa una degradación apreciable del mismo [50]. Se asume que la fotodegradación es la principal vía de descomposición en el medio, y que su principal producto de degradación es el resultado de la pérdida de un grupo alquil, siendo este compuesto conocido como M1 [37]. Hasta el momento se han identificado otros dos productos de degradación (M2 y M3) [51],

---

<sup>5</sup>Concentración a la cual se produce una reducción en crecimiento del 50 %.

<sup>6</sup>Concentración letal media.



todos ellos se especifican a continuación:

- ⇒ M1 ó GS26575 (2-metiltio-4-*tert*-butilamino-6-amino-*s*-triazina)
- ⇒ M2 (3-(4-*tert*-butilamino-6-metiltiol-*s*-triazin-2-ilamino)propionaldehido)
- ⇒ M3 (N,N'-di-*tert*-butil-6-metiltiol-*s*-triazina-2,4-diamina)

En el Reino Unido se ha mostrado una especial atención sobre el problema que presentan estos compuestos en el medio marino, existiendo numerosas citas bibliográficas donde se referencia la existencia de los mismos en el ecosistema. El Irgarol 1051 ha sido detectado en puertos deportivos, estuarios y áreas costeras, habiéndose encontrado en agua niveles de hasta 1421 ng/L [52] y en sedimentos de hasta 1011 ng/g [53]. En 2002 el uso de este compuesto en pinturas antiincrustantes fue prohibido por su administración [33], mostrándose tras la medida una disminución apreciable de las concentraciones presentes, siendo estas similares a los niveles hallados en otras áreas del continente [54, 55].

En Europa se ha referenciado con asiduidad la presencia de Irgarol 1051 en agua de mar, hallándose en muestras procedentes de Alemania [56], Suecia [44], Grecia [57], Holanda [58], Italia [59], etc. También ha sido frecuente su determinación en el otros continentes como Asia y América. Se ha detectado en Japón [60], Singapur [61], Puerto Rico [62], California [63], Florida [64], etc. Igualmente se ha referenciado su presencia en aguas dulces, como por ejemplo en el lago Geneva en Suiza [65], o en diversos ríos de Portugal [66].

En España este tipo de estudios se han centrado, sobre todo, en la costa mediterránea, hallándose Irgarol 1051 en muestras de agua procedentes de Cataluña [67, 68] y Andalucía [69, 70].

## 1. Compuestos antiincrustantes

---

En lo referente a los niveles hallados en el sedimento, hay que decir que el Irgarol 1051 es el compuesto menos hidrofílico de la familia de las triazinas, lo que implica mayor afinidad por la materia particulada que otros compuestos similares como la Antrazina. Aunque existen referencias que afirman que el Irgarol 1051 se encuentra principalmente en estado disuelto [71–73], otros autores sugieren una acumulación del mismo en el sedimento [74]. Evidentemente, la cantidad de compuesto ligado al sedimento va a depender de las características del mismo y de la concentración de sólidos en suspensión; generalmente en el ambiente de un puerto deportivo estos niveles son bajos (inferiores a 20 mg/L) [71].

Existe un menor número de estudios centrados en la determinación de estos compuestos en muestras de sedimentos. En muchos casos, las concentraciones halladas son inferiores al límite de detección de la metodología empleada, aunque niveles apreciables de Irgarol 1051 han sido determinados en el Reino Unido [35, 53, 75], Grecia [76], Alemania [56] Francia [77], Japón [78], etc. En España se ha detectado en la costa catalana [79] y andaluza [80].

En cuanto a la determinación en muestras biológicas, el número de referencias es incluso inferior. Ha sido hallado en muestras de macrófitos procedentes de Suiza [65] y de Australia [81]. También se ha estudiado su presencia en diferentes bivalvos como mejillones y almejas, pero en la mayoría de los casos, las concentraciones de Irgarol 1051 halladas se encuentran a niveles inferiores al límite de detección [65, 82, 83].

En lo que respecta a sus productos de degradación, el M1 ha sido hallado en muestras de agua de mar y sedimentos procedentes del Reino Unido [55] y Japón [60], en muestras de agua de mar procedentes de la costa oeste de Estados Unidos [63] y en muestras de sedimentos y mejillones de Hong Kong [83]. En

España se ha hallado en muestras de agua de mar [84] y sedimentos [79]. Los otros dos productos de degradación (M2 y M3) han sido hallados recientemente en muestras de mejillones y sedimentos procedentes de Hong Kong [83].

### **Diurón**

Junto con el Irgarol 1051, este compuesto es uno de los biocidas antiincrustantes más estudiado. Se usa frecuentemente en tierra como herbicida y se puede encontrar con asiduidad en agua dulce, pero su uso en las pinturas antiincrustantes hace que, en los últimos tiempos, también sea frecuente su determinación en aguas portuarias y costeras [16], observándose concentraciones considerablemente superiores en épocas de mayor afluencia de embarcaciones de recreo [58]. También se ha observado un aporte importante del mismo a través de los ríos como consecuencia de su uso en la agricultura [85].

En cuanto a la toxicidad hacia los organismos autótrofos, el Diurón muestra el mismo patrón de comportamiento que el Irgarol 1051, se encarga de inhibir la fotosíntesis. Para la especie *Selenastrum capricornotum* se ha referenciado un valor de NOEC de  $1.5 \times 10^4$  ng/L [86], mientras que niveles entre 100 y 1000 ng/L disminuyen apreciablemente la actividad fotosintética en las fanerógamas marinas *Halophila ovalis* y *Zostera capricornata* [87]. En cuanto a organismos animales muestra una menor toxicidad, siendo por ejemplo el valor de NOEC para larvas y huevos del erizo marino *Anthocidaris crassipina*, igual a  $1 \times 10^6$  ng/L. Algunos de sus productos de degradación pueden mostrarse más tóxicos, por ejemplo el valor de NOEC para la 3,4-dicloroanilina (DCA) en el crustáceo *Daphnia longispina* es de  $1 \times 10^3$  ng/L [88].

Se considera que el Diurón es relativamente persistente en el medio acuático.

## 1. Compuestos antiincrustantes

---

Se ha intentado medir su degradación en agua de mar y no se ha apreciado una degradación evidente después de 42 días de observación [48]. Por otro lado, los estudios conducentes a determinar su degradación bajo radiación ultravioleta han concluido que la fotólisis del Diurón parece ser un proceso minoritario [89]. Se han estimado valores de tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) que abarcan periodos desde un mes hasta un año en agua de mar [16, 89]. Los productos de la degradación aeróbica y anaeróbica de este herbicida son:

- ⇨ DCPMU (1-(3,4-diclorofenil)-3-metilurea)
- ⇨ CPDU (1-(3,4-diclorofenil)-3,1-dimetilurea)
- ⇨ DCPU (1-(3,4-diclorofenil)urea)
- ⇨ DCA (3,4-dicloroanilina)
- ⇨ Demetildiurón

El tiempo de vida media estimado para el Diurón en sedimentos y en condiciones anaeróbicas es de 14 días, mientras que para sus productos de degradación CPDU, DCPMU y DCPU es de 35, 1 y 3 días respectivamente [90].

Se ha determinado en muestras de agua de mar procedentes del Reino Unido [52], Japón [91], Holanda [58], Suecia [44], Italia [92], Estados Unidos [63], etc., determinándose también con asiduidad en España [68, 84, 93].

El Diurón se muestra relativamente soluble en agua (tabla 1.7), encontrándose principalmente en fase disuelta y siendo levemente adsorbido por el material particulado. En comparación con otros biocidas destinados al mismo fin (Irgarol 1051, Clorotalonil y Diclofluanid) se ha observado que el Diurón muestra una menor preferencia por la fase sólida [94]. Se ha detectado su presencia en muestras

de sedimentos procedentes del Reino Unido [75, 95], Japón [60], Tailandia [96] y Vietnam [82]. En España se ha hallado en sedimentos procedentes de la costa catalana [79].

En cuanto a su tendencia a la bioacumulación, diversos autores afirman que es baja debido a su solubilidad y bajo valor de  $\log K_{ow}$  [37, 82]. Se ha determinado su presencia en muestras de mejillones procedentes de Tailandia [96].

También ha sido frecuente la detección de sus productos de degradación. Por ejemplo, se han hallado DCPMU, DCPU y CPDU en muestras de agua de mar procedentes del Reino Unido [48]. En lo referente a España se ha detectado la presencia de Demetildiurón en muestras de agua de mar [84] y en muestras de sedimentos junto con DCPU [79].

### **Diclofluánid**

El Diclofluánid es también otro de los biocidas comúnmente utilizados en las pinturas antiincrustantes, pero debido a varias de sus características no es frecuente su determinación en muestras de agua de mar. Es poco soluble en agua y presenta un alto valor de  $\log K_{ow}$  (tabla 1.7), por lo que suele adsorberse sobre sedimento [35]. Además, se muestra altamente inestable en un medio básico como es el agua de mar, con tiempos de vida media que varían entre 15 días y menos de 10 minutos, de hecho a un pH igual a 9 la descomposición en su principal producto de degradación es inmediata [46].

Los estudios de degradación llevados a cabo han revelado tiempos de vida media del orden de horas o pocos días. En agua de mar a 25 °C se ha determinado un tiempo de vida media igual a 18 h [97], mientras que a 15°C otros autores han documentado un tiempo de 19.2 horas [48]. También es susceptible de

## 1. Compuestos antiincrustantes

---

fotodegradarse, bajo condiciones de sol natural se ha determinado un tiempo de vida media igual a 53 h [98]. En cuanto a la biodegradación en sedimentos y bajo condiciones anaerobias, se ha calculado un tiempo de vida media inferior a medio día en estado disuelto y 1.4 días cuando se encuentra asociado a partículas de pintura [90]. Sus principales productos de degradación son:

- ⇨ DMSA (*N,N*-dimetil-*N'*-fenil-sulfamida)
- ⇨ *n*-diclorofluorometiltio-anilina
- ⇨ Anilina

Respecto a su toxicidad en organismos autótrofos, se han determinado valores de EC50 iguales a  $6.4 \times 10^4$  ng/L y  $1.33 \times 10^5$  ng/L para la microalga *Selenastrum capricornotum* después de 32 y 72 h de exposición respectivamente [86]. En animales se han observado valores de EC50 iguales a  $3.7 \times 10^5$  ng/L para el crustáceo *Daphnia magna* y  $1.1 \times 10^4$  ng/L y para el pez *Oncorhynchus mykiss* [46].

Ha sido hallado en muestras de agua de mar procedentes de Grecia [99] y de España [84] y en muestras de sedimentos procedentes del Reino Unido [35], Grecia [76], Vietnam [82], Japón [78] y España [79]. En algunos de estos casos, se ha observado que las mayores concentraciones en sedimentos están ligadas a la época del año donde la afluencia de barcos de recreo es mayor [35]. Su principal producto de degradación (DMSA) se ha detectado en muestras de agua de mar procedentes de Grecia [100] y España (tentativamente) [101].

### Clorotalonil

Diversos estudios en estuarios del Reino Unido han mostrado que el Clorotalonil entra en grandes cantidades a través de los ríos debido a su empleo en

la agricultura [35], aunque también ha sido determinado en muestras de agua de mar procedentes de diferentes puertos deportivos de Grecia, estando su presencia, en este caso, directamente ligada con su uso en pinturas [99]. En España se ha monitorizado en varios estudios junto a otros agentes antiincrustantes, pero en ningún caso se ha podido referenciar concentraciones superiores al límite de detección de la metodología empleada [69, 84, 102].

Algún autor considera que la adsorción del Clorotalonil sobre el sedimento es una de las principales vías de eliminación de la columna de agua [37], mientras que otros afirman que aquél se encuentra generalmente en estado disuelto [48]. A parte de haber sido hallado en muestras de sedimento procedentes de estuario (Reino Unido) [35], se ha determinado en sedimentos procedentes de diferentes puertos de Grecia [76].

El Clorotalonil es susceptible de degradarse en la columna de agua, presentando un tiempo de vida media de pocas horas [103] y estando su degradación influenciada tanto por la actividad biológica como por la luz solar. En agua de mar a 15°C se ha estimado un tiempo de vida media igual a 2.8 días [48], mientras que en el sedimento, este compuesto muestra una mayor persistencia con una vida media que varían entre 1 y 2 meses [16]. Se han detectado seis productos de degradación procedentes de la fotólisis del Clorotalonil, habiéndose identificado cinco de ellos, entre los cuales se encuentra una pareja de isómeros [104]. Dichos compuestos son:

- ⇒ Benzamida
  
- ⇒ Cloro-1,3-dicianobenceno
  
- ⇒ Dicloro-1,3-dicianobenceno

## 1. Compuestos antiincrustantes

---

⇒ Tricloro-1,3-dicianobenceno

En cuanto a su toxicidad para especies no objetivo, se han documentado valores de NOEC iguales a  $3.5 \times 10^3$  ng/L y  $2.9 \times 10^4$  ng/L para el alga *Navicula pelliculosa* y la planta acuática *Lemna gibba* respectivamente. En organismos animales como el crustáceo *Daphnia magna* se ha referenciado un valor de NOEC igual a  $6.0 \times 10^2$  ng/L tras 21 días de exposición [46].

### TCMTB

Varios autores han estudiado la presencia de este compuesto en el medio marino desde el punto de vista de su uso como agente antiincrustante, en ningún caso se han encontrado concentraciones superiores a los límites de detección de las técnicas empleadas [48, 52, 70, 84, 93, 105, 106]. Los datos medioambientales disponibles de este compuesto corresponden a descargas del mismo relacionadas con su uso como agente fungicida en agricultura y en tratamientos de maderas [37].

Se considera que el TCMTB no se muestra persistente en el medio, ya que rápidamente se descompone en sus principales productos de degradación, MBT (2-mercaptobenzotiazol) y MTBT (2-(metiltio)-benzotiazol). Es susceptible de sufrir hidrólisis, degradación biológica y fotólisis [37]. El tiempo de vida media estimado en agua de mar es de 37 días [48], mientras que, bajo condiciones de luz solar, éste se ve reducido a pocas horas [16].

En cuanto a su toxicidad en organismos animales, se ha documentado un valor de EC50 igual a  $2.4 \times 10^4$  ng/L para el crustáceo *Daphnia magna* y de LC50 igual a  $2.1 \times 10^4$  ng/L para el pez *Oncorhynchus mykiss* [46].



### 4-Cloro-meta-cresol

Aunque en alguna ocasión se ha estudiado este compuesto en el medio marino, no se ha detectado la presencia del mismo en muestras procedentes de puertos deportivos [107]. Además de su empleo como agente antiincrustante, este biocida puede aparecer en el medio como resultado de los principales procesos llevados a cabo en determinadas industrias (tratamiento de papel y pulpa, plásticos, tintes y textil) y como producto de degradación de herbicidas y fungicidas empleados en la agricultura. Se ha determinado su presencia en altas concentraciones en aguas de río procedentes de Portugal [108] y en aguas de mar procedentes de la costa catalana [109].

### Tiram

Si bien el Tiram es mencionado en la literatura científica como un agente antiincrustante empleado en las pinturas náuticas [14], hasta el momento no se ha referenciado la presencia del mismo en el medio debido a este uso. En cuanto a su descomposición, se ha documentado que sufre una rápida hidrólisis ( $t_{\frac{1}{2}} < 1d$ , pH=9) y fotodegradación ( $t_{\frac{1}{2}} = 8.8h$ ) [16,37]. Además el Tiram es el principal producto de la hidrólisis del Ziram (bis(dimetilditiocarbamato) de zinc), un fungicida que también es empleado en las pinturas antiincrustantes.

Como indicativo de la toxicidad que manifiesta en organismos vegetales acuáticos, valores de EC50 iguales a  $1.6 \times 10^4$  y  $1.5 \times 10^4$  ng/L han sido determinados para las especies *Selenastrum capricornutum* y *Lemna gibba* respectivamente [110].

### 1.3. Evaluación del riesgo ecológico

El riesgo potencial debido a la presencia de un determinado compuesto o conjunto de compuestos en el medio acuático, puede ser determinado previamente o posteriormente a su introducción. Mediante la realización de un muestreo se puede conocer la exposición que sufre el ecosistema al compuesto en cuestión, pero, aunque podamos conocer estos niveles, para evaluar el riesgo que producen los mismos en el medio es necesario recurrir a predicciones. En determinadas ocasiones, incluso los niveles de exposición han de ser simulados. Otro factor que se ha de tener en cuenta es la variabilidad en la tolerancia que muestran las diferentes especies que forman el ecosistema.

La aproximación más rudimentaria que se emplea en la evaluación del riesgo ecológico es la comparación entre los niveles estimados de exposición y umbrales de efectos adversos. El cálculo del cociente de riesgo (HQ)<sup>7</sup> (ecuación 1.3) es el método más simple para su estimación, se basa en la relación de los niveles estimados u observados y un nivel de seguridad, basado en datos de toxicidad para los posibles organismos receptores (TRV)<sup>8</sup> [111, 112].

$$HQ = \frac{\textit{Exposición}}{\textit{TRV}} \quad (1.3)$$

El uso de este cociente es útil sólo para contradecir la presunción de que los organismos presentes en el medio se ven expuestos a niveles nocivos, ya que en su cálculo se toman medidas conservadoras para asegurar que ninguna situación susceptible de provocar efectos adversos sea declarada como segura.

---

<sup>7</sup> *Hazard Quotient.*

<sup>8</sup> *Toxicant Reference Value.*

Sin embargo, la aproximación exacta a la evaluación del riesgo debe hacerse mediante probabilidades, además, el uso de los cocientes de riesgo ha sido tachado como una medida extremadamente conservadora que debe utilizarse en las primeras etapas de evaluación para descartar compuestos de análisis posteriores. Con frecuencia herbicidas y pesticidas sobrepasan el umbral de HQ igual a 1, ya que, han sido diseñados para mostrarse tóxicos frente a determinados grupos de organismos, por lo que su evaluación necesita de análisis más complejos [111].

La evaluación probabilística del riesgo ecológico (*Probabilistic Risk Assessment*, PRA) es un análisis que está tomando relevancia en los últimos diez años, habiéndose implementado por diversas instituciones como la Agencia de Protección Medioambiental Norteamericana (EPA) [113]. Este análisis es aplicable cuando se disponen tanto de datos toxicológicos como de exposición y está basado en diversas aproximaciones realizadas por varios autores [41, 114–116]. Mediante el ajuste de los datos de toxicidad y de exposición a distribuciones log-normales, se observa que ambas curvas comparten un área que es proporcional al riesgo existente (figura 1.4). Posteriormente, los datos son linealizados, siendo posible conocer probabilidades de exceder un porcentaje determinado de especies que forman el conjunto de datos de toxicidad. Mediante la comparación de estas probabilidades con los valores establecidos como umbrales, es posible determinar si el riesgo es aceptable o no, siendo esta información muy útil a la hora de tomar las decisiones correspondientes. Este análisis se ha llevado a cabo para determinar el riesgo debido a la presencia de diversos contaminantes en ríos [117], así como para grupos de compuestos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) [118] o productos farmacéuticos [119]. También se ha empleado en el medio marino para compuestos antiincrustantes como el TBT [116] y más recientemente para el

## 1. Compuestos antiincrustantes

---

Irgarol 1051 y su principal producto de degradación en Estados Unidos [120,121]. En Europa, este análisis se ha llevado a cabo para el Diurón e Irgarol 1051 en las aguas costeras del Golfo de Nápoles (Italia) [59].

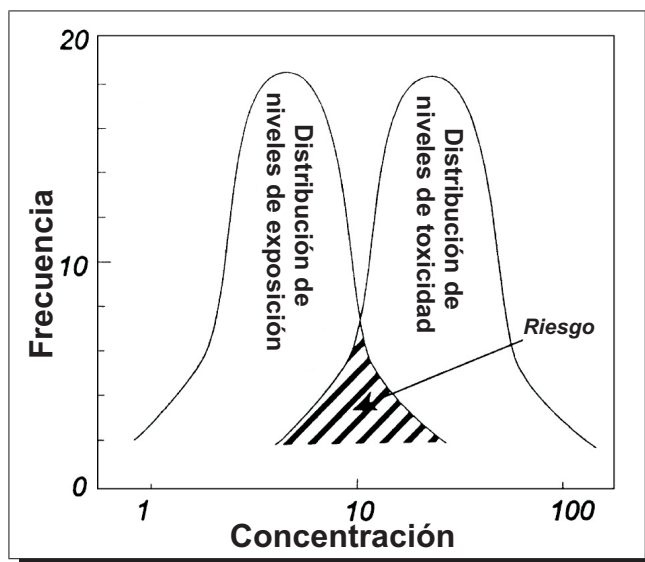


Figura 1.4 .- Distribuciones log-normales de datos de exposición y toxicidad (adaptado de la referencia [111]). El área de solapamiento aporta una idea del riesgo existente.

# Capítulo 2

## *Técnicas de extracción y determinación*

### **2.1. Extracción de muestras líquidas**

Debido a que los biocidas antiincrustantes suelen encontrarse a niveles traza en el agua de mar (ng/L), es necesaria la aplicación de técnicas de extracción que permitan un enriquecimiento de la muestra. La extracción líquido-líquido (LLE) y la extracción en fase sólida (SPE) son, por este motivo, las técnicas más empleadas.

La extracción líquido-líquido presenta como principales desventajas el elevado consumo de tiempo y de disolvente orgánico, así como la aparatosidad a la hora de trabajar con grandes volúmenes de muestra, provocando que la misma sea considerada como una técnica tediosa. A pesar de estos inconvenientes, todavía abundan las referencias donde se emplea para determinar algunos biocidas antiincrustantes en agua de mar [35, 61, 121–127], siendo el diclorometano el principal extractante utilizado.

Por otro lado, la extracción en fase sólida ha ido ganando terreno en los

últimos años, siendo en la actualidad, la técnica más comúnmente empleada para la extracción de biocidas en agua de mar.

A parte de estas técnicas, para la extracción de biocidas antiincrustantes se han optimizado otros procedimientos alternativos basados en la microextracción en fase sólida (SPME) [107,128,129], la microextracción con disolventes (SME) [130] o el uso de inmusorbentes [68].

### Extracción en fase sólida (SPE)

Los comienzos de la extracción en fase sólida se remontan treinta años atrás, encontrándose comercialmente disponibles los primeros cartuchos en 1978 y las primeras precolumnas diseñadas para su variante en línea (*on line*) en la década de los 80 [131]. En la actualidad, se considera la principal alternativa a la LLE, ya que ofrece una serie de ventajas que la hacen idónea a la hora de realizar extracciones a partir de muestras líquidas, siendo la principal técnica empleada en análisis farmacéutico, medioambiental, clínico, industrial y alimentario [132]. Además, diversos métodos oficiales han adaptado sus protocolos para dar cabida a esta técnica de extracción [133]. Entre sus ventajas, cabe destacar el empleo de un menor volumen de disolvente orgánico, el disponer de una gran variedad de fases sólidas y formatos, la posibilidad de almacenar las muestras un mayor tiempo, la alta preconcentración que se puede llegar a obtener, una fácil automatización, la capacidad de eliminar impurezas de la muestra, un bajo coste y un menor consumo de tiempo. Entre sus desventajas, nos podemos encontrar con una incompatibilidad del eluato con el sistema de determinación empleado, siendo necesaria la evaporación y redisolución del mismo en un disolvente más adecuado [134].

## 2. Técnicas de extracción y determinación

---

La extracción en fase sólida aplica los principios de la cromatografía líquida en la retención los compuestos de interés a partir de la matriz [131]. Cuando hacemos pasar la muestra a través del lecho adsorbente, los analitos se quedarán retenidos en el mismo, siendo posteriormente eluidos en un volumen menor de disolvente [134]. Los mecanismos de retención que aparecen durante la extracción en fase sólida responden a fuerzas de Van der Waals (interacciones apolares), puentes de hidrógeno, interacciones dipolo-dipolo (interacciones polares) e interacciones catión-anión [135].

### **Etapas de la extracción en fase sólida**

La figura 2.1, muestra las diferentes etapas en las que se lleva a cabo la extracción y preconcentración de los analitos mediante la extracción en fase sólida.

- ① Acondicionamiento: se hace pasar a través de la fase sólida diferentes disolventes o mezclas de los mismos con el fin de activar la superficie de las partículas que forman el relleno y preparar el lecho para la carga de la muestra.
- ② Carga de la muestra: se hace pasar la muestra a un flujo determinado a través de la fase sólida, quedándose retenidos, a parte de los analitos de interés, otros compuestos que muestren mayor afinidad por el adsorbente que por la matriz.
- ③ Lavado: se intenta eluir las interferencias que puedan afectar a nuestro análisis mediante el empleo de un disolvente selectivo para las mismas. Ha de asegurarse en este paso que no se eluyen los analitos.
- ④ Elución: se emplea un disolvente que sea capaz de arrastrar los analitos de

## 2.1. Extracción de muestras líquidas

interés de la fase sólida en un pequeño volumen, consiguiendo además, un enriquecimiento de la muestra.

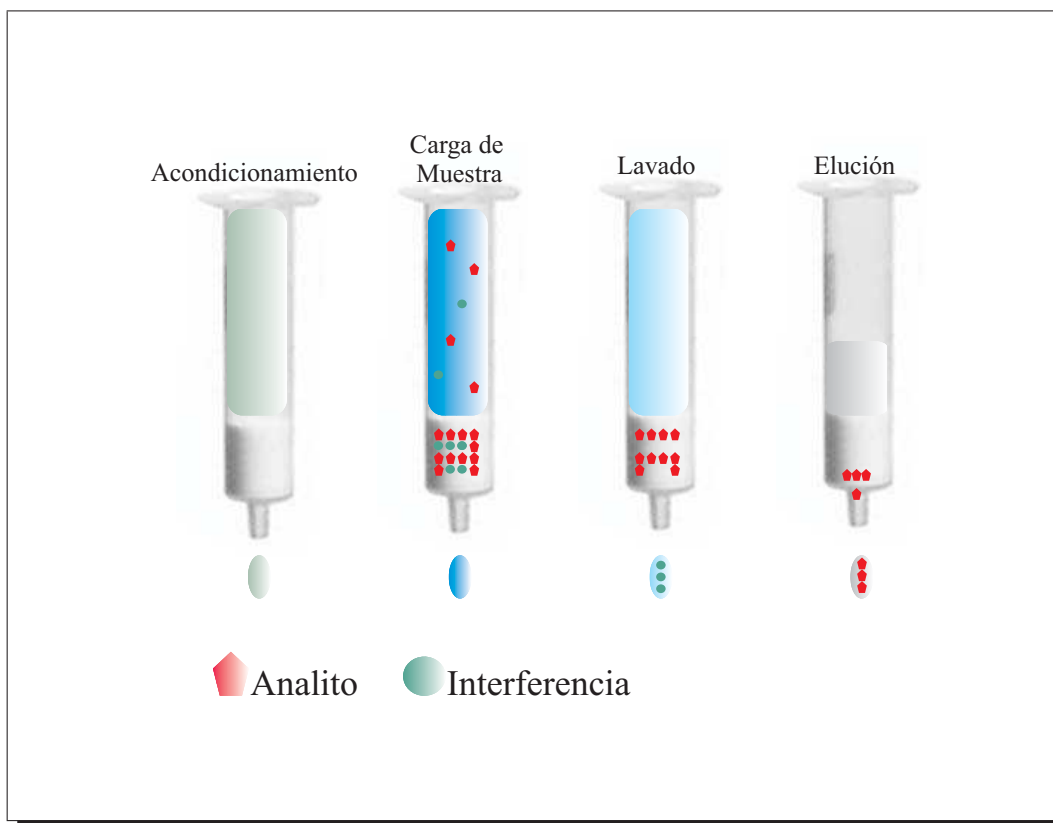


Figura 2.1.- Etapas de la extracción en fase sólida.

A la hora de plantear una extracción en fase sólida, hay que tener en cuenta; la naturaleza y propiedades fisico-químicas de los analitos, el tipo de matriz en la que se encuentran, la técnica cromatográfica involucrada en el análisis, así como, la detección a emplear. Los parámetros que hay que optimizar para obtener un adecuado rendimiento en la extracción son: el tipo y cantidad de adsorbente, el



## 2. Técnicas de extracción y determinación

---

volumen de muestra a emplear, el volumen y la composición del disolvente de lavado y la composición y volumen de disolvente utilizado en la elución.

① Volumen, formato y tipo de adsorbente: el volumen y formato de la fase sólida va a depender del volumen de muestra, la capacidad para retener a los analitos de interés y del volumen de eluato que se quiera obtener. Por otro lado la selección del adsorbente adecuado va a depender de las características de los analitos, la naturaleza de la matriz y del método analítico que se desee emplear. Además, se debe tener en cuenta las posibles interferencias. Dependiendo de estas características podemos decantarnos por trabajar en:

- ⇨ Fase reversa: nuestros analitos de interés son apolares o medianamente apolares, mientras que la matriz en la que se encuentran es polar o moderadamente polar. La fase sólida empleada es apolar y las interacciones que se forman entre la superficie de la misma y los distintos analitos suelen responder a fuerzas de Van der Waals. Los materiales poliméricos, de carbón y diversos grupos unidos a sílica gel son los comúnmente empleados en la fase reversa.
- ⇨ Fase normal: los analitos a extraer son polares, mientras que la matriz donde se encuentran es apolar o moderadamente apolar. La fase sólida se caracteriza por poseer diversos grupos polares en su superficie que interaccionan con los analitos que se pretenden extraer. Los materiales empleados en fase normal suelen ser rellenos de sílica gel unidos a grupos alquil de cadena corta con diversos grupos polares en sus extremos.
- ⇨ Intercambio iónico: útil para compuestos que se encuentran ionizados. Existen diferentes materiales para retener aniones y cationes, siendo el

principal mecanismo de retención las atracciones electroestáticas que se crean entre los compuestos y los diferentes grupos superficiales de la fase sólida.

- ② Volumen de muestra: el volumen de muestra a emplear va a depender de la preconcentración que queramos obtener. Es frecuente que en análisis medioambiental los analitos se encuentren muchas veces a niveles traza, siendo necesario preconcentrar la muestra varios órdenes de magnitud para poder detectar la presencia de los mismos. Este volumen no sólo depende de nuestros objetivos, también debemos conocer el máximo volumen de muestra que puede ser extraída sin afectar a la recuperación de los analitos. Este concepto se conoce con el nombre de "volumen de ruptura" (*breakthrough volume*) y debe ser estudiado desde el punto de vista experimental [131].
- ③ Volumen y composición del disolvente de lavado: es necesario estudiar este parámetro con el fin de eliminar de forma eficaz las impurezas presentes en la fase sólida sin afectar a las recuperaciones de nuestros analitos, aunque existen otras alternativas, como el empleo de adsorbentes y pasos de elución altamente selectivos para evitar la presencia de las mismas [135].
- ④ Volumen y composición del disolvente de elución: se aplica un disolvente que muestra una mayor afinidad por los analitos que la fase sólida donde están retenidos. Es frecuente utilizar mezclas de disolventes cuando se intentan eluir compuestos con diversas propiedades. Interesa que el volumen en esta etapa sea pequeño, sin que afecte a las recuperaciones, con el fin de obtener la mayor preconcentración posible o disminuir el tiempo necesario para llevar el extracto a sequedad.

### Aplicación en biocidas antiincrustantes

Como adsorbentes en la extracción en fase sólida para diversos compuestos antiincrustantes, se han empleado rellenos convencionales de C<sub>18</sub> [56, 57, 65, 68, 72, 105, 136], diversos materiales poliméricos [58, 67, 69, 70, 84, 93, 100, 101] y carbón grafitado (*grafitized carbon black*, GCB) [84]. El formato más empleado es el de cartuchos, aunque algunos autores se han decantado por el empleo de discos que disminuyen de forma apreciable el tiempo de extracción [100, 137, 138]. También se han optimizado diversas metodologías mediante la automatización y acoplamiento de la extracción (SPE *on line*) a la cromatografía de gases (CG) [67] y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) [68, 93, 101].

### 2.2. Extracción de muestras sólidas

Los niveles de los biocidas antiincrustantes encontrados en sedimentos están, en la mayoría de los casos, en el orden de unidades o decenas de ng/g [35, 56, 76, 78, 80, 139]. Las extracciones empleadas se basan fundamentalmente en técnicas convencionales como el Soxhlet [56] o la extracción por agitación o ultrasonidos con disolventes orgánicos, seguidas de un paso de limpieza mediante SPE [35, 76, 95, 100, 138].

Estas técnicas convencionales se caracterizan, en la mayoría de los casos, por un consumo elevado de disolvente orgánico y por procesos demasiados complejos y tediosos que aumentan de forma considerable el tiempo de análisis requerido. Otras técnicas alternativas han sido optimizadas para la extracción de varios compuestos antiincrustantes en muestras de sedimentos marinos, mostrando buenos resultados y presentándose como completamente válidas para su empleo

sobre muestras reales. Entre estas alternativas, nos podemos encontrar el empleo de la microextracción en fase sólida (SPME) después de la extracción por ultrasonidos [140], la extracción asistida por fluidos supercríticos (SFE) con CO<sub>2</sub> [80] y la extracción asistida por microondas (MAE) empleando agua como extractante [139].

De todas las alternativas empleadas hasta la fecha, la extracción asistida por microondas presenta una serie de ventajas que la hacen especialmente útil a la hora de realizar múltiples extracciones. En comparación con la extracción asistida por fluidos supercríticos, el tiempo empleado por muestra es menor [141], además de resultar más sencilla su optimización [142].

### **Extracción asistida por microondas (MAE)**

Las primeras experiencias con microondas en laboratorio se remontan a 1975, en aquel momento se empleó para la digestión de muestras biológicas en la determinación de metales [143]. En cuanto a su uso en la extracción de compuestos orgánicos, los primeros estudios datan de 1986 [144], mostrándose como una técnica bastante útil debido a varias ventajas de peso como la reducción drástica del tiempo de análisis, la posibilidad de realizar extracciones simultáneas, el empleo de elevadas temperaturas y el menor consumo de disolventes. En la segunda mitad de la década de los noventa fue cuando el número de publicaciones científicas en las que se optimizaban metodologías mediante la extracción asistida por microondas empezó a aumentar de forma considerable [142], encontrándonos incluso con métodos oficiales y patentes en donde se hace uso de la misma [145].

## 2. Técnicas de extracción y determinación

---

### Fundamento

Las microondas son ondas electromagnéticas que cubren el rango de frecuencia comprendido entre 300 MHz y 300 GHz, pudiéndose emplear para la transferencia de información o como vectores de energía. Cuando estas ondas pasan a través de un material capaz de absorber parte de la energía, ésta se transforma en calor. Las ondas empleadas en un horno microondas poseen una frecuencia de 2450 MHz, lo que corresponde con una longitud de onda de 12.2 cm y una energía de 0.23 cal/mol. Esta frecuencia sólo puede causar rotación en las moléculas. La componente eléctrica de la onda cambia  $4.9 \times 10^9$  veces por segundo, lo que genera un movimiento desorganizado de las moléculas polares.

La transformación de la energía electromagnética en calor se produce por dos procesos; la conducción de iones y la rotación de los dipolos. La conducción de iones genera calor debido a la resistencia del medio al flujo de los mismos, la dirección de la migración de estos iones cambia tantas veces como cambia el campo al que están sometidos, haciendo que se produzcan múltiples colisiones con las moléculas de la disolución. Por otro lado la rotación de los dipolos ocurre en las moléculas polares que intentan alinearse con el campo eléctrico, produciendo una agitación en la disolución que aumenta las colisiones entre moléculas y por lo tanto provocan un incremento en la temperatura.

En cuanto a los dispositivos empleados, nos vamos a encontrar con dos tipos diferentes; los que trabajan a presión atmosférica y los que trabajan con una presión superior, pudiéndose alcanzar así temperaturas por encima del punto de ebullición del disolvente empleado y favoreciendo este hecho la extracción de los analitos [146].

### Parámetros que afectan a la extracción

Los principales parámetros que afectan a la extracción asistida por microondas son:

- ① Disolvente empleado: la elección del disolvente adecuado es fundamental a la hora de obtener buenos resultados. Debemos considerar la capacidad del mismo para la absorción de microondas, la interacción con la matriz y la solubilidad que presentan los analitos en su seno. Existen tres alternativas en la elección del disolvente que se relacionan con el mecanismo de extracción:
  - ⇒ Empleo de disolventes que absorben fuertemente la energía transmitida por las microondas como el metanol, etanol, diclorometano, agua o disoluciones acuosas de surfactantes, mientras que la matriz se muestra transparente a dichas ondas.
  - ⇒ Empleo de mezclas de disolventes en el que uno de ellos se muestra transparente al campo aplicado y el otro absorbe la energía transmitida consiguiendo el aumento de temperatura deseado. Las mezclas más comunes son las de hexano:acetona, etil acetato:ciclohexano, isooctano:acetona, agua:hexano, agua:xileno y agua:tolueno en diferentes proporciones.
  - ⇒ Empleo de un disolvente transparente a la radiación de las microondas y de una matriz que muestra una alta absorción debido, por ejemplo, al alto contenido en agua. Se suele emplear para la extracción de diferentes compuestos orgánicos como aceites a partir de muestras de vegetales.
- ② Volumen de disolvente: el volumen necesario por muestra varía entre los 10 y 30 mL y debe ser suficiente para cubrir por completo la

## 2. Técnicas de extracción y determinación

---

muestra durante el proceso de extracción. Generalmente, en las técnicas convencionales, un aumento del volumen de disolvente acarrea un aumento en las recuperaciones, pero diversos estudios han descrito lo contrario para la extracción asistida por microondas, de hecho se ha evidenciado en determinados casos que volúmenes pequeños (10 mL por 5 g de muestra) son suficientes para realizar la extracción [142].

- ③ Temperatura: como se comentó anteriormente, en los sistemas de recipientes cerrados se pueden alcanzar temperaturas superiores al punto de ebullición del disolvente. El aumento en la temperatura facilita la desorción de los analitos de la matriz, además, de aumentar la solubilidad de los mismos en el disolvente y la penetración de éste en la muestra. Cuando se trabaja con compuestos termolábiles las altas temperaturas pueden provocar una disminución en las recuperaciones.
- ④ Tiempo: en comparación con las técnicas convencionales, el tiempo de extracción es muy inferior. En la mayoría de los casos la extracción es eficaz con tan sólo 10 min o menos. Al igual que la temperatura, el tiempo de extracción ha de ser controlado para evitar posibles pérdidas de aquellos compuestos termolábiles.
- ⑤ Potencia: la potencia aplicada debe ser suficiente para que todas las muestras alcancen en el menor tiempo posible la temperatura adecuada de extracción. Suele guardar una relación con el tiempo durante el cual se aplica: a mayores potencias, el tiempo de extracción requerido suele ser menor.
- ⑥ Matriz: la naturaleza de la matriz va a determinar las interacciones existentes con los diferentes analitos, y la capacidad de la extracción para disolverlos.

Al margen de estas características, el tiempo durante el cual el analito se encuentra en contacto con la muestra, puede afectar también a los resultados. Se ha observado que en muestras envejecidas, las recuperaciones tienden a decrecer en comparación con muestras enriquecidas recientemente.

Todas estas variables se suelen tener en cuenta cuando se desarrolla una metodología mediante la extracción asistida por microondas. Es frecuente que se emplee la quimiometría (diseños ortogonales y factoriales) para la optimización de la misma [147], ya que así se pueden evaluar las posibles interacciones que se crean en el proceso y disminuir el número de ensayos necesarios para llevar a cabo dicha tarea.

Tras la extracción con microondas es necesario filtrar la muestra, y cada vez es más común, emplear un paso de limpieza para eliminar interferencias del extracto. Los pasos de limpieza se suelen realizar mediante una extracción líquido-líquido o una extracción en fase sólida.

### 2.3. Determinación

La cromatografía, tanto de gases como de líquidos, son las técnicas dominantes a la hora de determinar biocidas antiincrustantes en muestras medioambientales. En la cromatografía de gases, se han empleado el Detector Termiónico de Llama (FTD) y el Detector de Captura de Electrones (ECD) [99, 130, 148], aunque los detectores más utilizados son los de masas, como los detectores de Trampa de Iones (IT) [137] o de cuadrupolos [76], siendo las ionizaciones más frecuentes las de Impacto Electrónico (EI) e Ionización Química (CI) [69, 70] y los modos de trabajo tanto en tándem [69] como en SIM (*Selected Ion Monitoring*) [149]. Sin embargo, la cromatografía de gases no nos permite determinar la presencia de



## 2. Técnicas de extracción y determinación

---

Diurón debido a su descomposición a las altas temperaturas alcanzadas en la técnica, y aunque se han optimizado metodologías en donde se derivatiza [150], la cromatografía líquida es la técnica que impera a la hora de su análisis.

En cuanto a la cromatografía líquida, se han empleado los detectores de absorbanza UV-visible de diodos (*Diode Array Detector*, DAD) [57, 91, 151] y principalmente los detectores de masas de Trampa de Iones [105], de simple cuadrupolo [92] y de triple cuadrupolo [106], trabajando fundamentalmente en modo SIM y en tándem. En cuanto a las interfases, se ha empleado tanto la Ionización por Electrospray (ESI) [58] como la Ionización Química a Presión Atmosférica (APCI) [101].

## *Capítulo 3*

### *Objetivos*

La presencia de biocidas procedentes de las pinturas antiincrustantes en el medio marino es un problema de escala mundial, pudiéndose encontrar este tipo de compuestos en áreas portuarias a lo largo de todo el planeta. Diversas normas internacionales han prohibido los compuestos que se venían utilizando desde la década de los setenta y en la actualidad parte de los biocidas alternativos se han restringido en el Reino Unido a causa de los problemas medioambientales que pueden acarrear. En España, los estudios sobre la determinación de estos compuestos en muestras reales se han centrado sobre todo en la costa mediterránea, no existiendo información disponible de otras áreas.

En la actualidad, la isla de Gran Canaria soporta una gran actividad náutica debido al uso recreacional de embarcaciones, el transporte de mercancías y pasajeros y la pesca, además en un futuro no muy lejano se pretende aumentar el número de atraques destinados a la actividad deportiva. Debido a la creciente demanda, la máxima autoridad insular (Cabildo de Gran Canaria) ha proyectado

---

incrementar el número de atraques mediante el Plan Territorial Especial de Ordenación de Puertos Deportivos Turísticos e Infraestructuras Náuticas cuyo avance se aprobó para la participación pública el 16 de noviembre de 2009, siendo este trámite uno de los procedimientos de evaluación ambiental previos a la ejecución del proyecto [152].

Teniendo en cuenta todos los factores comentados, es de interés, tanto a nivel internacional como local, conocer y referenciar por primera vez la presencia de biocidas antiincrustantes en el medio marino costero de la isla de Gran Canaria; por lo que los objetivos que se plantean en la presente Tesis Doctoral son los siguientes:

- ① Establecimiento de las condiciones de separación cromatográfica de los compuestos en estudio mediante la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y su acoplamiento a detectores de absorbancia UV-Visible (*diode array detector*, DAD en este caso) y de masas (triple cuadrupolo).
- ② Optimización de una metodología de extracción de los compuestos de interés en agua de mar, mediante la extracción en fase sólida (SPE), de fácil aplicación y bajo consumo de tiempo; además, dicha metodología, debe permitirnos determinar la presencia de los compuestos de interés en muestras reales a niveles traza (ng/L).
- ③ Optimización, mediante diseños factoriales, de una metodología de extracción de los compuestos en estudio en muestras de sedimentos haciendo uso de la extracción asistida por microondas (MAE), y un posterior paso de limpieza mediante SPE. Esta metodología ha de presentar, frente a las técnicas convencionales, una reducción considerable en tiempo que permita

### 3. Objetivos

---

su aplicación a numerosas muestras reales.

- ④ Realización de un muestreo prolongado en el tiempo de muestras de agua de mar y sedimentos en diferentes puertos deportivos, comerciales y pesqueros de la isla de Gran Canaria.
- ⑤ Análisis de las muestras de agua de mar y sedimentos recolectadas en las zonas de estudio mediante las metodologías optimizadas.
- ⑥ Análisis estadístico e interpretación de los resultados para los niveles de biocidas encontrados.
- ⑦ Estimación del posible riesgo ecológico debido a la presencia de dichos compuestos en las aguas estudiadas.

## *II. EXPERIMENTAL*

---

# Capítulo 4

## *Aparatos y reactivos*

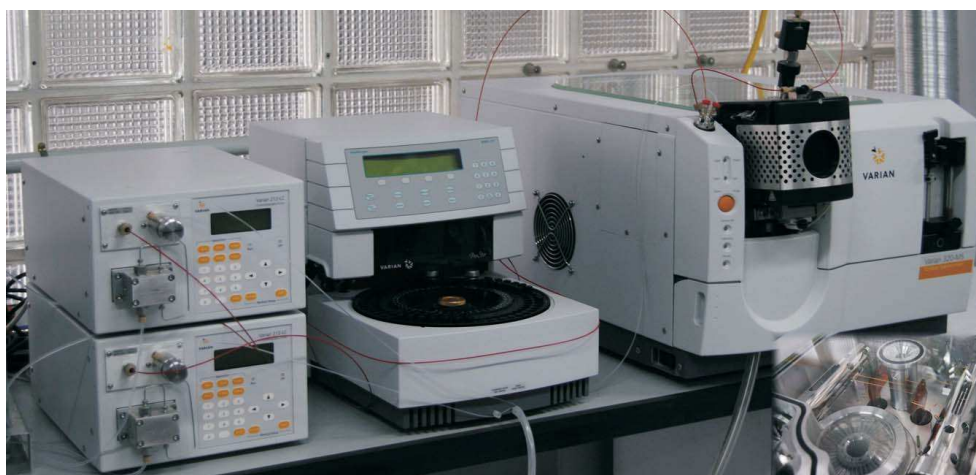
### 4.1. Aparatos utilizados

#### HPLC-DAD

Para la determinación de los compuestos en estudio y la optimización de las metodologías de extracción se empleó un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC, figura 4.1 (a)) con detector de absorbancia UV-visible de diodos (DAD, Varian Ibérica). El sistema lo compone una bomba ternaria (modelo Varian 240) acoplada a un inyector automático (modelo Varian 410) con selector de volumen de inyección, un horno con capacidad para cuatro columnas (modelo Varian 500) y un detector de absorbancia UV-visible de diodos (modelo Varian 330). La columna empleada fue Waters Nova-Pak C<sub>18</sub> de 150mm×3.9mm y de 4μm de tamaño de partícula precedida de una precolumna ChromGuard C<sub>18</sub> de Varian. El software empleado para el tratamiento y adquisición de los cromatogramas fue Workstation versión 6.5.



(a) HPLC-DAD.



(b) LC-MS.

Figura 4.1 .- Sistemas cromatográficos empleados.

## LC-MS/MS

La identificación y cuantificación de los analitos de interés en las muestras estudiadas se llevó a cabo en un cromatógrafo líquido de alta resolución acoplado

#### 4. Aparatos y reactivos

---

a un detector de masas (LC-MS) de triple cuadrupolo de Varian (Modelo 320), equipado con una interfase de ionización por electro spray (ESI) (figura 4.1 (b)). El sistema además cuenta con dos bombas específicas para LC-MS (modelo Varian 212) y un inyector automático (modelo Varian 410). La columna empleada fue una Varian Pursuit UPS C<sub>18</sub> 2.4 de 50×2.0 mm y 2.4μm de tamaño de partícula, diseñada específicamente para aportar una rápida resolución. El gas de secado y nebulización (N<sub>2</sub>) con una pureza superior al 99 % fue suministrado por un generador Zefiro LC MS 35. El software empleado para la adquisición y tratamiento de los cromatogramas fue Workstation versión 6.9.

#### Microondas

El sistema de extracción empleado para muestras sólidas fue un microondas modelo Multiwave B30MC06A (figura 4.2) de la marca Anton Paar (Graz, Austria). Este modelo permite el control del



Figura 4.2 .- Microondas.

tiempo y la potencia, así como la visualización de la temperatura individual de cada vaso. Está equipado con un rotor 6EVAP, con capacidad para 6 vasos de PFA, modelo MF100, que permiten un volumen máximo de 50 mL cada uno.



### Sistema de SPE

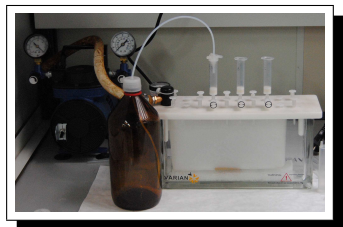


Figura 4.3.- Sistema de SPE.

El sistema empleado en la extracción en fase sólida fue un Manifold VacElut 20 de Varian (figura 4.3) con capacidad para realizar 20 extracciones simultáneas y diseñado para albergar tubos de ensayo de 16×100 mm. Para conseguir pasar los diferentes disolventes y el total de la muestra a través de la fase sólida, el sistema se encontraba acoplado a una bomba de vacío.

## 4.2. Reactivos y disoluciones

### Reactivos

Los biocidas empleados en el presente estudio (Tiram, 4-Cloro-meta-cresol, Diurón, TCMTB, Clorotalonil, Diclofluanid e Irgarol 1051) y el patrón interno (Diurón- $d_6$ ) fueron suministrados por la casa comercial Dr. Ehrenstorfer (Alemania) con una pureza igual o superior al 98 %. Los disolventes utilizados en las fases móviles fueron metanol, calidad *HPLC gradient grade*, y agua y metanol, calidad *LC-MS*, todos ellos suministrados por Panreac (Barcelona, España). El agua empleada en la fase móvil en los análisis por HPLC-DAD y en diversas disoluciones, agua Milli-Q, se obtuvo a través de una unidad de purificación Millipore (MA, EEUU). Por otro lado, el ácido fórmico y el formiato amónico (*calidad análisis químico, PRS*) empleados para la preparación de la fase móvil en LC-MS fue suministrado por Panreac, mientras que el gas de colisión utilizado en los análisis de MS/MS fue Argón calidad *premier*, suministrado por Carburos

#### 4. Aparatos y reactivos

---

Metálicos (Barcelona, España). Todos los disolventes empleados en las fases móviles fueron filtrados a través de filtros de membrana Millipore de 47 mm de diámetro y de 0.22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro.

El disolvente utilizado para la extracción líquido-líquido (diclorometano, *reagent grade*) fue suministrado por Sharlau (Barcelona, España).

Para la determinación del contenido de materia orgánica en sedimentos, se empleó ácido sulfúrico al 96% de riqueza y dicromato potásico y sal de Mohr (sulfato de hierro (II) y amonio hexahidratado) de la calidad *pro-análisis* (Panreac).

#### Extracción en fase sólida

Los cartuchos empleados en la extracción en fase sólida fueron: Sep-Pak Vac C<sub>18</sub> (500 mg) y Oasis HLB (200 mg) de Waters (Madrid, España) y Mega BE-FL (1000 mg), Envirelut pesticide (500 mg) y Bond Elut-ENV (500 mg) de Varian (Madrid, España).

#### Disoluciones

Las disoluciones patrón de los biocidas objeto de estudio, se realizaron mediante pesada directa de 25 mg de cada uno de ellos, y su posterior dilución en 25 mL de metanol, obteniendo una concentración final de 1000 mg/L. Dichas disoluciones, fueron almacenadas a 4°C y en oscuridad. Las disoluciones menos concentradas fueron preparadas cada día de trabajo a partir de las anteriores.

# Capítulo 5

## *Muestreo*

El muestreo de aguas se llevó a cabo entre los meses de mayo de 2007 y mayo de 2009 sobre un total de 26 puntos, mientras que el de sedimentos se realizó entre los meses de enero de 2008 y mayo de 2009 sobre 7 puntos. Dichos muestreos se llevaron a cabo de forma bimestral en el puerto comercial de Las Palmas de Gran Canaria, el puerto deportivo del Real Club Náutico de Gran Canaria, el puerto deportivo de Las Palmas de Gran Canaria, el puerto pesquero de Arguineguín, el puerto deportivo de Puerto Rico y el puerto de Mogán (figura 5.1)<sup>1</sup>. En las tablas 5.1 y 5.2 se desglosa por meses y puertos el número total de muestras de agua de mar y sedimentos recolectadas.

---

<sup>1</sup>En figuras y tablas son denominados como: La Luz (Puerto comercial de Las Palmas de Gran Canaria), Club Náutico (Puerto deportivo del Real Club Náutico), Muelle Deportivo (puerto deportivo de Las Palmas de Gran Canaria), Mogán (puerto de Mogán), Puerto Rico (ambas dársenas, Base y Escala, del puerto deportivo de Puerto Rico), Puerto Rico Base o Puerto Rico B. (Puerto Base de Puerto Rico), Puerto Rico Escala o Puerto Rico E. (Puerto Escala de Puerto Rico) y Arguineguín (puerto pesquero de Arguineguín).

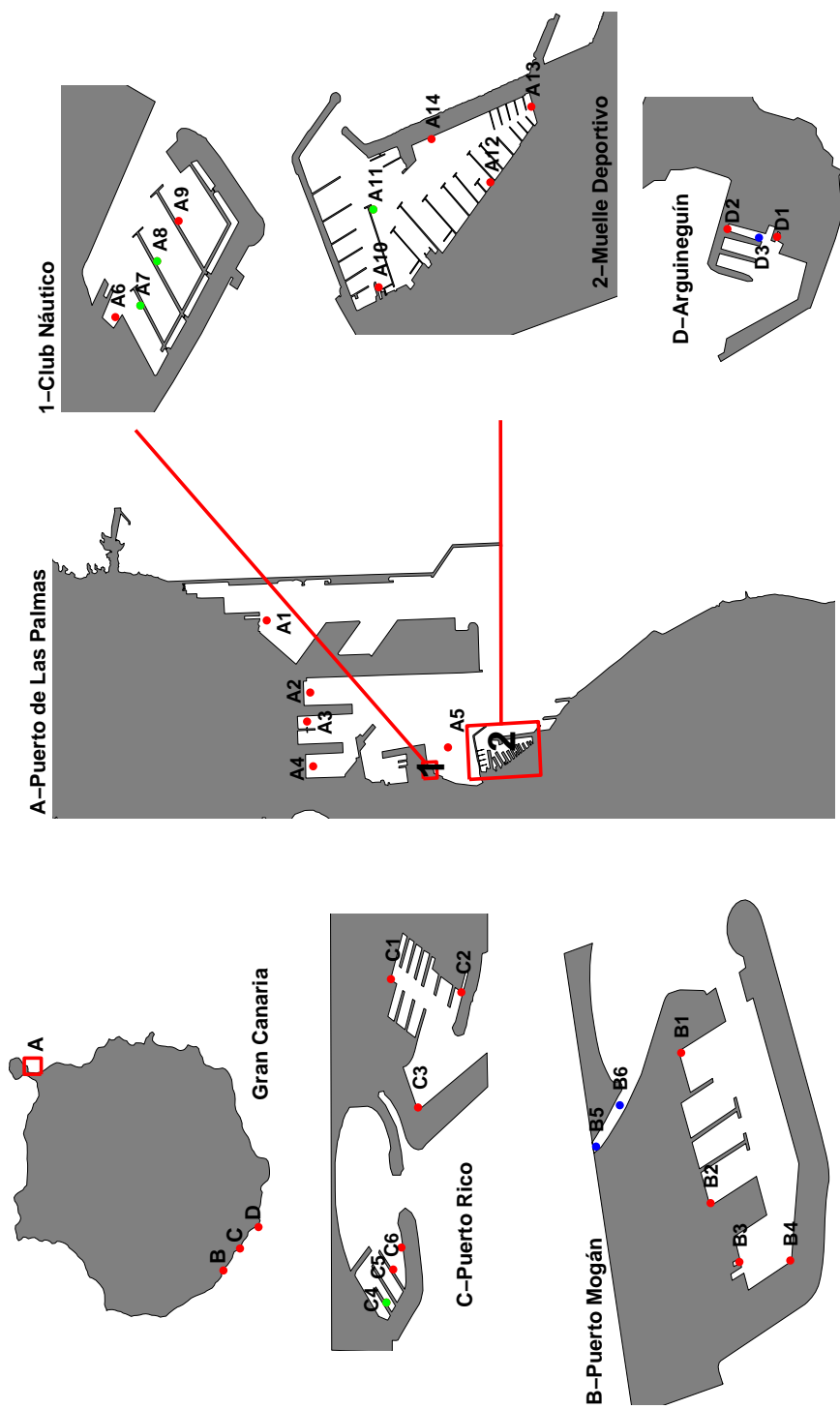


Figura 5.1.- Puntos de muestreo. Los emplazamientos marcados con color rojo corresponden a muestras de agua de mar, los de color azul a muestras de sedimentos y los de color verde a ambas muestras.

## 5. Muestreo

---

Tabla 5.1 .- Muestras de agua de mar recolectadas.

<i>Meses</i>	<i>Puertos<sup>a</sup></i>						<b>TOTAL</b>
	<i>A</i>	<i>A<sub>1</sub></i>	<i>A<sub>2</sub></i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	
Mayo 07	5	4	5	4	6	2	26
Julio 07	5	4	5	4	6	2	26
Septiembre 07	5	4	5	4	6	2	26
Noviembre 07	4	4	5	4	6	2	25
Enero 08	5	4	5	4	6	2	26
Marzo 08	5	4	5	4	6	2	26
Mayo 08	5	4	5	4	6	2	26
Julio 08	5	4	5	4	6	2	26
Septiembre 08	5	4	5	4	6	2	26
Noviembre 08	5	4	5	4	6	2	26
Enero 09	5	4	5	4	6	2	26
Marzo 09	5	4	5	4	6	2	26
Mayo 09	5	4	5	4	6	2	26
<b>TOTAL</b>	<b>64</b>	<b>52</b>	<b>65</b>	<b>52</b>	<b>78</b>	<b>26</b>	<b>337</b>

<sup>a</sup>A: Puerto de Las Palmas, A<sub>1</sub>: Club Náutico, A<sub>2</sub>: Muelle Deportivo, B: Mogán, C: Puerto Rico y D: Arguineguín.

## 5.1. Descripción y localización de los puertos objeto de estudio

---

Tabla 5.2 .- Muestras de sedimentos recolectadas.

<i>Meses</i>	<i>Puertos<sup>a</sup></i>					<b>TOTAL</b>
	<i>A<sub>1</sub></i>	<i>A<sub>2</sub></i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	
Enero 08	2	1	2	1	1	7
Marzo 08	2	1	2	1	1	7
Mayo 08	2	1	2	1	1	7
Julio 08	2	1	2	1	1	7
Septiembre 08	2	1	2	1	1	7
Noviembre 08	2	1	1	1	1	6
Enero 09	2	1	2	1	1	7
Marzo 09	2	1	2	1	0	6
Mayo 09	2	1	2	1	1	7
<b>TOTAL</b>	18	9	17	9	8	61

<sup>a</sup>A<sub>1</sub>: Club Náutico, A<sub>2</sub>: Muelle Deportivo, B: Mogán, C: Puerto Rico y D: Arguineguín.

### 5.1. Descripción y localización de los puertos objeto de estudio

#### Puerto de Las Palmas de Gran Canaria

El Puerto de Las Palmas de Gran Canaria (figura 5.2), también conocido como Puerto de La Luz o Puerto de La Luz y de Las Palmas de Gran Canaria, es un puerto comercial, pesquero y de pasajeros que se encuentra en la ruta de tránsito entre los continentes europeo, africano y americano, siendo el primer puerto del

## 5. Muestreo

---

Atlántico medio. Se sitúa a 210 Km de la costa africana y a 1 250 Km del continente europeo, siendo sus coordenadas geográficas 28° 09' N, 15° 25' O.



**Figura 5.2** .- Puerto de Las Palmas de Gran Canaria (imagen extraída de la referencia [153]).

Se le conoce como la gran estación de combustible del Atlántico, por el millón y medio de toneladas de productos petrolíferos que dispensa anualmente. Se encuentra conectado con 180 puertos en los cinco continentes a través de 30 líneas marítimas. Debido a la cercanía con los ricos caladeros africanos y a sus infraestructuras, es el primer puerto pesquero de la zona, con un movimiento anual de 400 000 toneladas de pescado congelado. Respecto al tráfico de contenedores, es el primer puerto de África occidental con cerca de 60 000 TEUs<sup>2</sup>. Por otro lado, también dispone del mayor centro de reparaciones de la zona, con capacidad para varar buques de hasta 30 000 toneladas; además mueve un importante tráfico de pasajeros con más de un millón de personas al año entre cruceros y tráfico regional [153].

---

<sup>2</sup>*Twenty-foot Equivalent Unit*: unidad de medida empleada en el transporte marítimo.

## **5.1. Descripción y localización de los puertos objeto de estudio**

---

En el Puerto de Las Palmas de Gran Canaria, se escogieron cinco puntos de muestreo de aguas (A1-A5, figura 5.1). El punto A1, se ubica próximo a la zona de reparaciones (astilleros Astican), en la dársena exterior, el resto de puntos de ubican en de la dársena interior. El punto A5, se localiza en frente de la playa de Las Alcaravaneras y próximo al acceso marítimo del Muelle Deportivo, siendo frecuente encontrar en esta ubicación embarcaciones de recreo (veleros y yates) fondeadas.

### **Puerto deportivo del Real Club Náutico de Gran Canaria**

El puerto deportivo del Real Club Náutico de Gran Canaria se emplaza dentro del puerto de Las Palmas de Gran Canaria, próximo al Muelle Deportivo. Comenzó a construirse en enero de 2005, empezando con su actividad en mayo de 2007. Consta de un total de 135 atraques destinados a veleros y yates, además, en el puerto se da cobijo a diferentes embarcaciones de pequeña eslora, destinadas a deportes acuáticos promovidos por el propio club (vela, remo, etc.). El porcentaje de ocupación en la actualidad ronda el 98 %.

Dentro de este puerto se seleccionaron cuatro puntos para la toma de muestras de agua (A6-A8, figura 5.1) y dos para sedimentos (A7 y A8).

### **Puerto deportivo de Las Palmas de Gran Canaria**

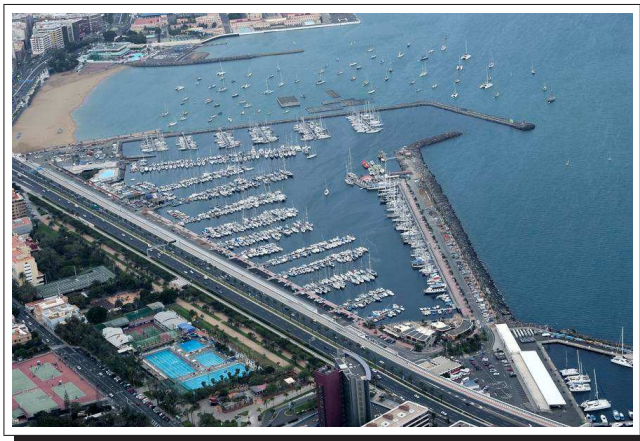
El puerto deportivo de Las Palmas de Gran Canaria o Muelle Deportivo (figura 5.3) es el mayor puerto deportivo del archipiélago. Situado dentro del Puerto de Las Palmas de Gran Canaria dispone de 1 134 amarres, pudiendo albergar barcos de hasta 45 m de eslora. Sus coordenadas geográficas son 28° 07' N, 15° 25' O. Las embarcaciones que predominan dentro de sus instalaciones



## 5. Muestreo

---

son veleros y yates, siendo este puerto una parada frecuente para todos aquellos que pretenden realizar la travesía transatlántica.



**Figura 5.3** .- Puerto deportivo de Las Palmas de Gran Canaria (imagen extraída de la referencia [153]).

En este puerto se seleccionaron cinco puntos de muestreo de aguas y uno de sedimentos (A10-A14, figura 5.1). El punto A10 se sitúa en las instalaciones de reparación (varadero), mientras que el punto A11 se ubica en el pantalán número 12, que en la actualidad se encuentra bajo concesión al Club Marítimo Varadero.

### **Puerto de Mogán**

El puerto de Mogán se encuadra dentro del término municipal del mismo nombre. Se localiza en el sur de la isla en plena área turística, siendo sus coordenadas exactas  $27^{\circ} 49' N$ ,  $15^{\circ} 40' O$ . Dispone de 216 atraques para embarcaciones de eslora comprendida entre 6 y 45 m. Se encuentra dividido entre puerto deportivo (área oriental) y puerto pesquero (área occidental), siendo la

## **5.1. Descripción y localización de los puertos objeto de estudio**

---

ocupación media anual del área deportiva del 92%. En sus proximidades nos encontramos con la playa de Mogán.

Dentro de este puerto se escogieron cuatro puntos de muestreo de aguas (figura 5.1), dos en el área deportiva (B1 y B2) y dos en la pesquera (B3 y B4). Debido a la imposibilidad de recolectar muestras de sedimentos dentro del mismo, dos puntos para su toma (B5 y B6) se situaron en la desembocadura del barranco próximo al puerto.

### **Puerto deportivo de Puerto Rico**

El puerto deportivo de Puerto Rico se encuentra en el mismo término municipal que el puerto anterior, Mogán. Su ubicación es 27° 46' N, 15° 37' O. Está constituido por dos dársenas bien diferenciadas. La dársena este alberga al Puerto Base, mientras que la dársena oeste al Puerto Escala. Entre ambas dársenas nos encontramos con la playa de Puerto Rico, que al igual que la playa de Mogán, se caracteriza por elevada afluencia de personas durante todo el año.

Dispone de un total de 531 atraques, 319 en el Puerto Base y 212 en el Puerto Escala, pudiendo albergar embarcaciones de hasta 45 m de eslora. La ocupación media anual ronda el 99%. En sus atraques abundan los yates y embarcaciones destinadas a diversas actividades y deportes acuáticos, siendo éstas un reclamo turístico importante.

Dentro del Puerto Base se establecieron tres puntos de muestreo de agua (C1-C3, figura 5.1), encontrándose el punto C2 en las instalaciones de reparación del puerto, mientras que en el Puerto Escala se establecieron otros tres puntos de muestreo de agua (C4-C6) y uno de sedimentos (C4).

### **Puerto pesquero de Arguineguín**

El puerto pesquero de Arguineguín se localiza también en el sur de la isla, siendo sus coordenadas geográficas 27° 45' N, 15° 41' O. Su principal uso es el de dar cobijo a la flota pesquera artesanal de la zona, siendo también empleado, en menor medida, como puerto deportivo. Cuenta con tres pantalanes de 200 m además de una superficie de servicios de 30 000 m<sup>2</sup>, donde se realiza el mantenimiento y las reparaciones de las embarcaciones y artes de pesca.

En este puerto, debido a su menor tamaño, sólo se establecieron dos puntos para toma de muestras de agua de mar (D1 y D2, figura 5.1) y un punto para sedimentos (D3).

### **5.2. Toma y conservación de muestras**

#### **Muestras de agua de mar**

Las muestras de agua de mar fueron recolectadas a pie desde los diferentes pantalanes o muelles, o bien, en el caso del Puerto de Las Palmas de Gran Canaria (puntos A1-A5), desde una embarcación de la Autoridad Portuaria (figura 5.4).

En la recolección se emplearon botellas de vidrio que fueron sumergidas a una profundidad aproximada de 1 m, posteriormente se transfirió el volumen de muestra a botellas de vidrio ámbar de 2.5 L que fueron empleadas en el traslado inmediato al laboratorio, allí las muestras fueron filtradas a través de filtros de membrana Durapore de 47 mm de diámetro y 0.65  $\mu$ m de tamaño de poro (Millipore, USA), y almacenadas en botellas de vidrio de 1 L a 4°C y en oscuridad hasta su análisis en las 48 h siguientes. Los análisis de todas las muestras se realizaron por duplicado.



**Figura 5.4** .- Sacan (embarcación empleada para el muestreo de aguas dentro del Puerto de Las Palmas de Gran Canaria).

### Muestras de sedimentos

Para la recolección de las muestras de sedimentos se empleó una Draga Van Veen (figura 5.5). Debido a la ausencia de una potencia de sedimentos adecuada dentro de los puertos, el número de puntos de muestreo de sedimentos fue inferior al de aguas, no pudiéndose recolectar, en la mayoría casos, ambas muestras en el mismo punto. Por este mismo motivo en el caso de Mogán, las muestras fueron recolectadas en la desembocadura del barranco anexo a las instalaciones portuarias (puntos B5 y B6, figura 5.1).

Tras su recolección, los sedimentos fueron almacenados en oscuridad y a 0 °C hasta que se procedió a su liofilización. Una vez tuvo lugar la misma, las muestras fueron homogeneizadas y tamizadas, recolectando sólo la fracción inferior a 0.3 mm que fue almacenada en botes de vidrio de color ámbar a 0 °C y en oscuridad hasta su análisis.

## 5. Muestreo

---



**Figura 5.5** .- Recolección de sedimentos con una draga Van Veen.

# Capítulo 6

## *Procedimientos analíticos*

### **6.1. Análisis cromatográfico por HPLC-DAD**

La optimización de las metodologías de extracción y el análisis de parte de los extractos de las muestras de agua de mar se llevaron a cabo en un cromatógrafo líquido con detector de diodos (DAD). La determinación de los analitos objeto de estudio se realizó mediante la inyección en el sistema cromatográfico de 30  $\mu\text{l}$  de muestra, siendo la fase móvil empleada agua (A) y metanol (B). Para la separación cromatográfica de los extractos de agua de mar (siete compuestos) se empleó el siguiente programa: de 0 a 3 min se mantuvo un régimen isocrático de 50 %:50 % (v/v) para posteriormente elevar la proporción de B hasta el 80 % en 14 min, mientras que en la optimización de la extracción a partir de muestras de sedimento (cuatro compuestos), se hizo uso de otro programa de elución en régimen isocrático (30 % de A y 70 % de B, v/v). El flujo de trabajo utilizado, en ambos casos, fue de 1 mL/min encontrándose la columna termostalizada a  $30\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ . Los tiempos

de retención, al igual que otros parámetros como longitudes de onda empleadas se detallan en el apartado 8.2.

Para confirmar la presencia de los biocidas objeto de estudio en muestras reales, además de emplear los respectivos tiempos de retención, se compararon los espectros de absorbanza obtenidos con los patrones.

## 6.2. Análisis cromatográfico por LC-ESI-MS/MS

Para la determinación de los parámetros analíticos de las diferentes metodologías optimizadas y la cuantificación de las muestras de agua de mar (desde mayo de 2008) y sedimentos, se empleó un cromatógrafo líquido acoplado a un detector de masas de triple cuadrupolo. El volumen de inyección empleado fue 10  $\mu\text{L}$  y se introdujo en el sistema en modo  $\mu\text{-pickup}$ <sup>1</sup>. La fase móvil empleada fue agua (A) tamponada con ácido fórmico (0.2 %) y formiato amónico (5 mM) y metanol (B), utilizándose para la separación cromatográfica un régimen isocrático (40 % de A y 60 % de B, v/v) y un flujo de 0.2 mL/min. La columna se mantuvo en todo momento a una temperatura de  $40\pm 0.2^\circ\text{C}$ .

De los siete compuestos que se empezaron a determinar mediante el detector de diodos, dos de ellos (4-Cloro-meta-cresol y Clorotalonil) no se ionizaron de forma adecuada mediante la interfase utilizada (ESI), mientras que el Tiram, mostró una rápida descomposición en las condiciones ácidas ( $\text{pH}\approx 4.4$ ) que presentaba la fase móvil empleada [38].

La temperatura del detector se mantuvo a  $60^\circ\text{C}$ . La presión del gas de secado

---

<sup>1</sup>La inyección en modo  $\mu\text{-pickup}$  hace que el volumen de muestra sea inyectado entre la fase móvil A, en este caso, consiguiéndose un estrechamiento de los picos y por lo tanto una mejor resolución.

## 6. Procedimientos analíticos

---

y de nebulización ( $N_2$  en ambos casos) se fijó en 50 psi y 30 psi respectivamente, mientras que la presión del gas de colisión (Ar) fue de 2 mTorr. El voltaje del detector se fijó, en cada una de las calibraciones, al valor máximo del intervalo dinámico extendido (*Extended Dynamic Range*, EDR). Los voltajes de escudo y aguja empleados fueron 0.6 kV y 5 kV respectivamente. El ancho de masas permitido en el primer cuadrupolo fue de 2 a.m.u., mientras que para el tercero fue de 1.5 a.m.u. El tiempo de permanencia (*dwell time*) de cada una de las transiciones fue de 0.1 s.

Para determinar los principales iones de cada compuesto, al igual que otros parámetros de interés, se inyectaron en el detector disoluciones individuales de 1 mg/L realizadas en fase móvil A, a un flujo de 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

### 6.3. Acondicionamiento de muestras

#### Muestras de agua de mar

Las muestras de agua de mar empleadas para la optimización de la metodología de extracción mediante SPE fueron recolectadas en la playa de Melenara, localizada en el este de la isla de Gran Canaria. Se recolectaron en recipientes de vidrio ámbar, se filtraron a través de filtros de membrana Durapore de 0.65  $\mu\text{m}$  (Millipore) y se almacenaron a 4 °C y oscuridad hasta su utilización. A estas muestras se les realizaron los análisis pertinentes para asegurar la ausencia de los analitos en estudio.

Para su empleo, el volumen necesario de agua de mar se enriqueció con una mezcla de los biocidas en estudio, se agitó vigorosamente y posteriormente se dejó reposar al menos durante 15 min.



### Muestras de sedimentos

El sedimento empleado en la optimización de la metodología de extracción asistida por microondas fue recolectado en el Club Náutico de Las Palmas de Gran Canaria, lejos de la influencia directa de buques y antes de que sus instalaciones empezaran a utilizarse de forma masiva para el atraque de embarcaciones de recreo. Este sedimento presentaba una composición fangosa. Para eliminar el contenido en agua del mismo, se sometió a una temperatura de 100 °C durante aproximadamente 4 horas. Posteriormente fue machacado y tamizado, recolectando únicamente la fracción inferior a 0.3 mm. Antes de hacer uso del mismo, se realizaron los análisis pertinentes con el fin de asegurar la ausencia de los analitos de interés.

En el acondicionamiento se empleó 1 g de sedimento, al cual se añadió el volumen necesario de la mezcla de los biocidas objeto de estudio, y se dejó secar a temperatura ambiente durante al menos 12 h antes de realizar cualquier extracción.

### 6.4. Extracción en fase sólida de muestras de agua de mar

Previo paso de las muestras a través de la fase sólida seleccionada, fue necesario el acondicionamiento de la misma con metanol (3×5 mL) y agua Milli-Q (3×5 mL). Posteriormente, se procedió a la carga de la muestra a un flujo no superior a 10 mL/min, para a continuación lavar y secar bajo vacío durante 5 min. Los biocidas retenidos en la fase sólida se extrajeron con metanol, ajustándose a continuación el volumen de extracto a 1 mL. Esto último fue necesario debido a que, durante el proceso de desorción, diversas pérdidas provocaban que el

## 6. Procedimientos analíticos

---

volumen final de eluato no fuera siempre el mismo. Los extractos obtenidos fueron almacenados en viales de 2 mL en oscuridad y a 0 °C hasta su análisis por cromatografía líquida.

### 6.5. Extracción asistida por microondas de sedimentos

En cada vaso de extracción, se alojó 1 g de peso seco de cada una de las muestras y se le añadió el volumen adecuado de patrón interno (Diurón-d<sub>6</sub>) y un volumen optimizado de disolvente. Cada uno de los vasos fue cerrado, asegurando el vacío, y alojados dentro del microondas al cuál se le aplicó el programa óptimo de potencia y tiempo para la extracción de los analitos de interés. Una vez concluyó el programa aplicado, las muestras se extrajeron del interior del microondas y se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante al menos 15 min para evitar pérdidas debidas a la evaporación del disolvente. A continuación, se filtró todo el sobrenadante a través de filtros de jeringa de nailon (Sharlau) de 25 mm de diámetro y 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro y se mezcló con un volumen fijo de agua Milli-Q, dicha mezcla fue agitada vigorosamente y se dejó reposar durante 10 min antes de aplicar la metodología de extracción por SPE.

### 6.6. Extracción líquido-líquido

La extracción líquido-líquido fue empleada a la hora de validar la metodología optimizada mediante SPE. Se seleccionó un embudo de decantación con capacidad para dos litros, en el que se alojó 1 L de agua de mar previamente acondicionada con la mezcla de los biocidas en estudio. Se realizó la extracción mediante la adición de diclorometano (2×50 mL), dejando 5 min de reposo entre

## 6.7. Determinación del contenido de materia orgánica

---

extracciones consecutivas. El volumen final de extracto fue llevado a sequedad en rotavapor: primero la mezcla de los dos lavados se alojó en un balón de 200 mL para posteriormente, cuando quedaban aproximadamente 5 mL, transferir dicho volumen a un balón de 10 mL donde se llevó a total sequedad. Finalmente, se redisolvió en 1 mL de metanol y se inyectó en el sistema cromatográfico.

El procedimiento empleado fue similar al utilizado por diferentes autores para la determinación de parte de los compuestos objeto de estudio [123,126].

## 6.7. Determinación del contenido de materia orgánica

Para la determinación del contenido de materia orgánica en sedimentos, se empleó el método de Sauerlandt, que se basa en la oxidación de la materia orgánica de la muestra por vía húmeda con dicromato potásico y ácido sulfúrico [154,155].

Se tomó 1 g de muestra previamente liofilizada y tamizada como se comenta en el apartado 5.2, se introdujo dicha muestra en un vaso de 250 mL y se mezcló con 50 mL de ácido sulfúrico concentrado, dejándose reposar de 5 a 10 min a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron lentamente 25 mL de una disolución 2 N de dicromato potásico, agitando y enfriando bajo el grifo repetidas veces. Posteriormente, dicha mezcla se transfirió a un matraz aforado de 250 mL y se calentó durante una hora y media a 125 °C, dejándose enfriar a temperatura ambiente el tiempo oportuno para que, acto seguido, se enrasara con agua destilada y se agitara para conseguir una mezcla homogénea. De esta disolución, se tomaron 10 mL y se pasaron a un matraz erlenmeyer donde se mezcló con 100 mL de agua desionizada, 3 gotas de ácido fosfórico y 5 gotas de una disolución de difenilamina al 1 % en ácido sulfúrico concentrado que actuó como indicador. Finalmente, se valoró el exceso de dicromato potásico que no reaccionó con la materia orgánica

## 6. Procedimientos analíticos

---

con una disolución de sal de Mohr 0.2 N.

El procedimiento fue llevado a cabo por duplicado para cada una de las muestras, siendo necesaria la realización de un blanco para poder realizar los cálculos. Además, se valoró la disolución de la sal de Mohr. Los resultados obtenidos para las diferentes muestras de sedimentos se presentan en la tabla 6.1.

**Tabla 6.1** .- Porcentaje de materia orgánica en las muestras de sedimentos.

<i>Muestra<sup>a</sup></i>	<i>Materia orgánica (%)</i>
A7	1.8
A8	2.0
A11	1.9
B5	2.0
B6	1.1
C4	2.2
D3	2.2

---

<sup>a</sup>Ver gráfico 5.1.

# Capítulo 7

## *Tratamiento de datos*

### 7.1. Análisis estadístico

#### Diseño factorial

Para la optimización de la metodología de extracción de los analitos de interés a partir de sedimentos, se emplearon diversos diseños factoriales, utilizándose para la construcción de los mismos el *software* Statgraphics Plus versión 5.1 (Manugistic, Rockville, MD, USA).

En la primera etapa de la optimización, se empleó un diseño factorial  $2^3$  para determinar las variables e interacciones que tienen un mayor peso sobre la recuperación de los distintos analitos, mientras que en una segunda etapa se empleó un diseño factorial  $3^2$ , dividido en tres bloques con un punto central para cada uno. Ambos diseños, se construyeron de forma aleatoria con el fin de evitar la influencia de otros factores no controlados que pudieran tener efecto sobre los resultados.

Para el cálculo de las correlaciones parciales y bivariadas entre variables independientes y variable dependiente, se hizo empleo del *software* SPSS versión 11.0 (SPSS Inc., Illinois, USA). Éstas nos permitieron determinar la influencia de las mismas sobre la recuperación de los diferentes analitos.

### Análisis de resultados en muestras reales

Con el fin de determinar patrones de comportamiento y diferencias entre los puertos y estaciones del año, se llevó a cabo un análisis estadístico de los resultados obtenidos a partir de las muestras estudiadas. Para ello, se seleccionaron todos los datos obtenidos en la determinación por LC-MS/MS.

Primero, se transformaron los datos<sup>1</sup> a logaritmos para, en la medida de lo posible, poder aplicar el análisis de la varianza (ANOVA) paramétrico. Se agruparon los datos por puertos, para determinar las diferencias entre los mismos, y por estación dentro de cada puerto, para poder conocer la evolución temporal de los compuestos detectados en cada uno de ellos. Antes de aplicar el ANOVA paramétrico, fue necesario verificar sobre cada conjunto de datos las hipótesis de partida de dicho análisis, siendo éstas las que se detallan a continuación:

- ① Los residuos del modelo lineal aplicado deben ser independientes y de media cero. Para ello, se observó la distribución de los mismos en función de los distintos factores a tener en cuenta dentro del modelo.
- ② Normalidad de los residuos. Se evaluó mediante el test de Shapiro-Wilk.
- ③ Homoscedasticidad (homogeneidad de varianzas) de los residuos. Se evaluó mediante el test de Bartlett.

---

<sup>1</sup>Sólo se seleccionaron los datos superiores al límite de detección del método empleado; únicamente una muestra de agua de mar presentó una concentración inferior para el Diurón.

## 7. Tratamiento de datos

---

Una vez se contrastaron dichas hipótesis, se determinó la existencia de diferencias entre los valores medios de los factores presentes dentro del conjunto de datos, mediante la aplicación del análisis de la varianza, identificando posteriormente dichas diferencias mediante el test de Diferencia Honestamente Significativa de Tukey (Tukey HSD). Aquellos datos que no cumplieran los requisitos citados, fueron analizados mediante contrastes no paramétricos. Se empleó el test de Kruskal-Wallis para determinar la existencia de diferencias significativas y el test de Wilcoxon-Mann-Whitney para su identificación.

Todos los contrastes empleados se evaluaron con un nivel de significación igual a 0.05 (nivel de confianza 95%). El análisis estadístico de la presente sección se realizó mediante el empleo del entorno de programación de libre distribución R [156] .

### 7.2. Evaluación probabilística del riesgo ecológico

Como se comentó en el apartado 1.3, la evaluación probabilística del riesgo ecológico se llevó a cabo mediante la comparación de los datos de exposición (obtenidos a partir de muestreos) y datos de toxicidad para las especies más vulnerables. En nuestro caso, se seleccionaron como datos de exposición los obtenidos a partir de las muestras de agua de mar analizadas mediante LC-MS/MS (mayo 2008-mayo 2009), ya que esta técnica nos permitió cuantificar por debajo de los niveles de toxicidad empleados. El conjunto de datos de toxicidad se extrajo a partir de listas publicadas recientemente por diversos autores que han llevado a cabo la misma evaluación [59,121]. La lista completa de los datos de toxicidad se puede observar en la tabla 7.1. Los compuestos que se sometieron a esta evaluación fueron el Diurón y el Irgarol 1051. Ambos son empleados como biocidas,

## 7.2. Evaluación probabilística del riesgo ecológico

siendo el principal grupo de riesgo los autótrofos acuáticos. Por este motivo, el riesgo ecológico de dichos compuestos se evalúa, fundamentalmente, sobre estos organismos.

**Tabla 7.1** .- Niveles de toxicidad empleados en la evaluación del riesgo ecológico del Irgarol 1051 y Diurón. Datos recopilados por diversos autores [59,121].

<i>Especies</i>	<i>Diurón</i> (ng/L)	<i>Irgarol 1051</i> (ng/L)	
	<i>Landa y col.</i> <sup>a</sup> [59]	<i>Landa y col.</i> <sup>a</sup> [59]	<i>Hall y col.</i> <sup>b</sup> [121]
<b><i>Micrófitos</i></b>			
<i>Achnanthes brevipes</i>	24 000		
<i>Amphora exigua</i>	31 000		
<i>Anabaena flos-aquae</i>		1 983	2 070
<i>Anabaena variabilis</i>	5 800		
<i>Ankistrodesmus minutissimus</i>	6 000		
<i>Chaetoceros gracilis</i>	36 000	1 100	
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	93 200		
<i>Chlorella mucosa</i>	40 000		
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	30 000		
<i>Chlorella vulgaris</i>	9 533		
<i>Chlorococcum sp.</i>			420
<i>Closterium ehrenbergii</i>		2 500	
<i>Dictyosphaerium pulchellum</i>	6 000		
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	20 046	473	560
<i>Eisenia bicyclis</i>		2 100	

<sup>a</sup>EC50.

<sup>b</sup>EC50-LC50.



## 7. Tratamiento de datos

Continuación

<i>Especies</i>	<i>Diurón</i> (ng/L)	<i>Irgarol 1051</i> (ng/L)	
	<i>Landa y col.</i> <sup>a</sup> [59]	<i>Landa y col.</i> <sup>a</sup> [59]	<i>Hall y col.</i> <sup>b</sup> [121]
<i>Hormidium flaccidum</i>	500 000		
<i>Isochrysis galbana</i>	5 797	445	440
<i>Navicula accomoda</i>			450
<i>Navicula incerta</i>	93 000		
<i>Navicula pelliculosa</i>		117	136
<i>Nitzschia closterium</i>	50 000		
<i>Pavlova lutheri</i>	18 000		
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	10 000		
<i>Porphyra yezoensis</i>	9 000	600	
<i>Porphyridium cruentum</i>	24 000		
<i>Scenedesmus acutus</i>	50 000		
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	50 000		
<i>Scenedesmus subspicantus</i>	36 000	3110	2 400
<i>Selenastrum capricornutum</i>	10 392	3 073	1 260
<i>Skeletonema costatum</i>		440	452
<i>Spirodela polyrhiza</i>	41 000		
<i>Spirulina platensis</i>	8 500		
<i>Stauroneis amphoroides</i>	31 000		
<i>Tetraselmis suecica</i>	2 050	560	
<i>Thalassiosira guillardii</i>	39 000		

<sup>a</sup>EC50.

<sup>b</sup>EC50-LC50.

## 7.2. Evaluación probabilística del riesgo ecológico

Continuación

<i>Especies</i>	<i>Diurón</i> (ng/L)	<i>Irgarol 1051</i> (ng/L)	
	<i>Landa y col.</i> <sup>a</sup> [59]	<i>Landa y col.</i> <sup>a</sup> [59]	<i>Hall y col.</i> <sup>b</sup> [121]
<i>Thalassiosira weissflogii</i>	95 000		
<b><i>Macrófitos</i></b>			
<i>Enteromorpha intestinalis</i>		2 500	
<i>Gracilaria tenuistipitata</i>	15 000	2 000	
<i>Lemna gibba</i>	3 152	1 650	
<i>Lemna minor</i>	25 000	8 100	
<i>Lemna perpusilla</i>	15 000		
<i>Potamogeton pectinatus</i>		6 100	6 757
<i>Ruppia maritima</i>		1 922	1 607
<i>Zostera marina</i>		2 500	2 500

<sup>a</sup>EC50.

<sup>b</sup>EC50-LC50.

Para el análisis probabilístico del riesgo ecológico de los datos se siguió el proceso comentado en diversas referencias [41, 111, 114]. A ambos conjuntos de datos (toxicidad y exposición) se les aplicó el mismo tratamiento. Primero, fueron ordenados de menor a mayor y transformados en logaritmos decimales ( $\log_{10}$ ). A continuación, se calculó el percentil ocupado por cada dato mediante el empleo de la siguiente fórmula:

$$\text{Percentil}(\%) = \frac{n}{N + 1} \times 100 \quad (7.1)$$

donde n es el número que marca el orden del dato dentro del conjunto y N

## 7. Tratamiento de datos

---

el número total de datos. Seguidamente, a los valores de percentil se les aplicó la función cuantil de una distribución normal con media y desviación estándar igual a la de los valores transformados en logaritmos. Se estimaron sendas regresiones lineales por mínimos cuadrados de los datos transformados ( $\log(\text{concentración})$  vs. cuantiles) y dichas rectas de regresión nos sirvieron para evaluar el riesgo debido a la presencia de los compuestos objeto de estudio. Escogiendo un umbral expresado como porcentaje de especies (5 y 10% en nuestro caso) y empleando la recta de regresión de los datos de toxicidad, fue posible conocer aquella concentración que afecta al umbral seleccionado, para posteriormente trasladar este dato a la recta de exposición, conociendo finalmente la probabilidad de superar dicho valor de toxicidad y por lo tanto afectar a más del porcentaje de especies seleccionado como umbral. En la figura 7.1, se muestra de forma simple el proceso para el cálculo de dichas probabilidades.

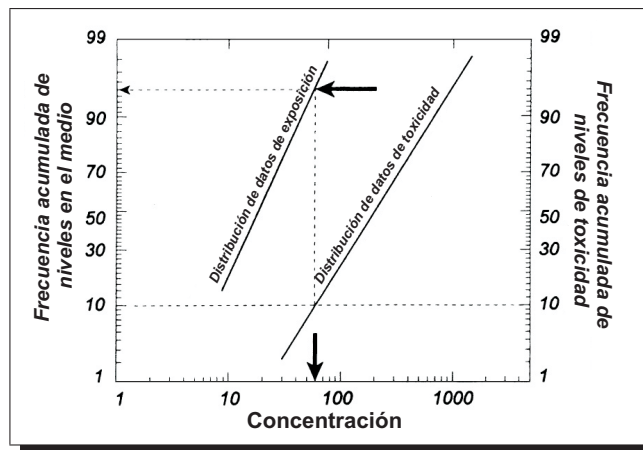
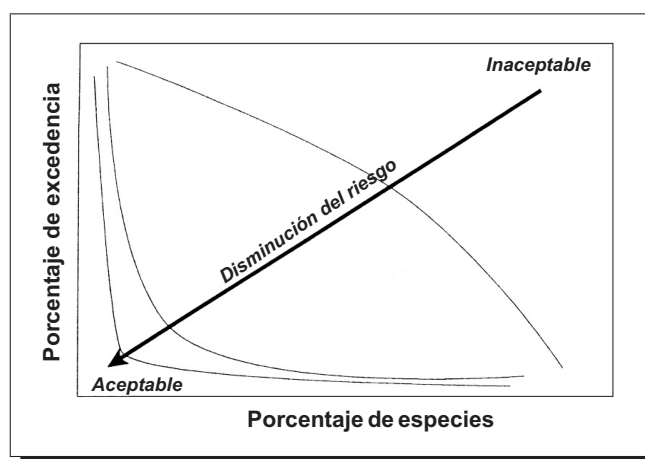


Figura 7.1 .- Linealización de datos de exposición y toxicidad (adaptado de la referencia [111]).

## 7.2. Evaluación probabilística del riesgo ecológico

El paso final de este análisis probabilístico fue la construcción de curvas de probabilidad conjunta (JPC)<sup>2</sup>, donde se representa el porcentaje de especies frente a la probabilidad de exceder los valores de toxicidad para dichos porcentajes. Como se muestra en la figura 7.2, curvas próximas a los ejes representan bajas probabilidades de que los compuestos en evaluación (de forma individual) hayan supuesto un riesgo para las especies más sensibles. Como medida de la proximidad de cada curva a los ejes, se tomó el área bajo la misma, que fue expresada como porcentaje frente al área total (el área que representa que en el 100 % de los casos se exceden las concentraciones de toxicidad para el 100 % de las especies).



**Figura 7.2** .- Ilustración del empleo de las curvas de probabilidad conjunta en la toma de decisiones (adaptado de la referencia [113]).

Para evaluar la normalidad de los datos de toxicidad y de exposición, se empleó el test de Shapiro-Wilk con un nivel de confianza del 95 %. Los datos de exposición (concentraciones medidas en el medio) se evaluaron y agruparon por meses y por

---

<sup>2</sup> *Joint Probability Curves.*

## 7. Tratamiento de datos

---

puertos, obteniendo porcentajes de excedencia de niveles de toxicidad para el 5 y el 10% de las especies y el porcentaje de área procedente de las curvas de probabilidad conjunta. Toda la evaluación probabilística se llevó a cabo utilizando el entorno de programación de libre distribución R [156].

*III. RESULTADOS Y  
DISCUSIÓN*

---

*AGUAS*

---

# Capítulo 8

## *Optimización de la extracción de biocidas en muestras de agua de mar mediante SPE*

Como se comentó en la Introducción y en los Objetivos de la presente Tesis Doctoral (capítulo 3), la extracción en fase sólida fue seleccionada para llevar a cabo la extracción de los diferentes biocidas en muestras de agua de mar, pero antes de comenzar con su empleo de forma rutinaria, fue necesario optimizar las diferentes variables inmersas en el proceso para poder conseguir una alta preconcentración además de reducir, en la medida de lo posible, el tiempo de análisis.

La extracción en fase sólida se basa en la retención selectiva de los analitos por una fase estacionaria y su posterior elución con disolventes. A diferencia de otras técnicas de extracción, donde la separación del analito de la matriz ocurre en un proceso global donde influyen diversos parámetros, en la extracción en fase sólida la extracción ocurre en varias etapas bien diferenciadas. Por este motivo, lo más frecuente es realizar la optimización de cada uno de estas etapas de forma



independiente.

Los diferentes parámetros que influyen en esta extracción y que, por lo tanto, fueron evaluados son:

- ① Tipo de fase sólida.
- ② Volumen de muestra.
- ③ Composición y volumen del disolvente de lavado.
- ④ Volumen y tipo de disolvente empleado como eluyente.

### 8.1. Variables en estudio

#### Tipo de fase sólida

Al realizar la optimización de una extracción en fase sólida, uno de los principales factores que es necesario controlar es el tipo de fase estacionaria más adecuada para nuestros análisis. Para la elección de la misma se enriquecieron varias muestras de agua de mar (100 mL) con un volumen determinado de la mezcla de los biocidas en estudio, resultando una concentración de 150  $\mu\text{g/L}$  de Diclofluanid y 50  $\mu\text{g/L}$  del resto de compuestos. Posteriormente, dichas muestras se hicieron pasar a través de cinco cartuchos empacados con diferentes materiales, escogiéndose aquél que mostró mejores recuperaciones (expresadas como áreas de pico). Se emplearon 10 mL de agua Milli-Q en el paso de lavado y 5 mL de metanol como eluyente. Las fases sólidas evaluadas fueron:

- ① Sep-Pak Vac  $\text{C}_{18}$  de 500 mg y un tamaño de partícula entre 55 y 105  $\mu\text{m}$ .
- ② Bond Elut-ENV (Estireno divinilbenceno) de 500 mg y con un tamaño de partícula de 125  $\mu\text{m}$ .

## 8. Optimización de la extracción de biocidas en muestras de agua de mar mediante SPE

- ③ Mega Bond Elut FL (Florisil) de 1000 mg y con un tamaño de partícula de 200  $\mu\text{m}$ .
- ④ Oasis HLB de 200 mg y con un tamaño de partícula de 30  $\mu\text{m}$ .
- ⑤ Envirelut Pesticide de 500 mg.

Los resultados obtenidos, expresados como áreas de pico, se muestran en la figura 8.1.

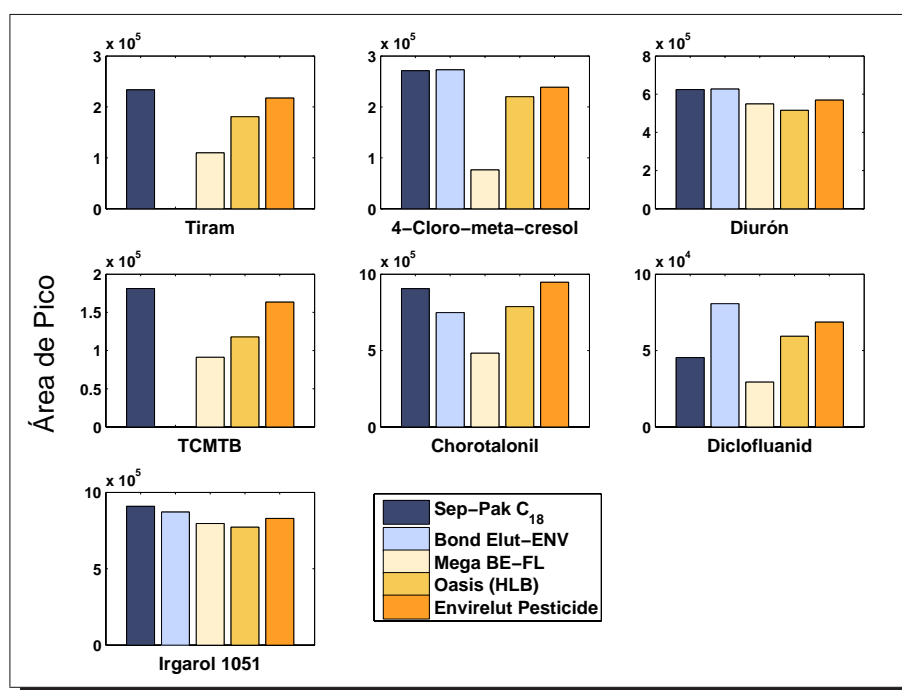


Figura 8.1 .- Áreas obtenidas mediante el empleo de diferentes fases sólidas (media de dos determinaciones).

Como se puede observar, mediante el empleo de la fase sólida Bond Elut-ENV no se obtuvo ninguna traza apreciable de Tiram ni de TCMTB, mientras que

el empleo de Mega Bond Elut FL reportó recuperaciones menores que el resto de fases sólidas evaluadas. Este hecho es fácilmente explicable, la fase estacionaria del Mega Bond Elut FL es  $\text{MgO}_3\text{Si}$  y funciona en fase normal, por lo que su uso más frecuente es la extracción de compuestos polares a partir de matrices apolares. El resto de fases estacionarias empleadas mostraron resultados similares entre ellas, aunque la línea base aportada por la fase sólida de  $\text{C}_{18}$  fue más irregular y con un mayor número de interferencias, por lo que su empleo fue descartado. De los dos tipos de fases restantes, se seleccionó la Envirelut Pesticide, ya que mostró resultados ligeramente superiores, además el formato es más adecuado para el empleo de grandes volúmenes de muestra en comparación con Oasis HLB (200 mg y 30  $\mu\text{m}$ ). Algún autor ha empleado con anterioridad fases sólidas similares para la determinación de Diurón e Irgarol 1051 a partir de muestras de agua de mar [75].

### Lavado

En la extracción en fase sólida puede resultar útil un paso de lavado que ayude a mejorar la selectividad de nuestro método. Con estos pasos de lavado lo que se pretende es eliminar aquellas interferencias que puedan entorpecer el análisis de los analitos de interés.

Para establecer la composición del disolvente de lavado más adecuado se empleó un volumen fijo de 5 mL de una mezcla variable de metanol/agua (0% - 20% en metanol), a la vez que también se realizó la extracción evitando dicho paso de lavado. Los resultados, expresados como área de pico, se muestran en la figura 8.2.

Cuando no se realizó el lavado de la fase sólida, el disolvente empleado en la elución arrastró sales retenidas en la misma, precipitando éstas posteriormente y siendo necesario filtrar los extractos a través de filtros de jeringa antes de introducir las muestras en el sistema cromatográfico. Respecto a los resultados,

## 8. Optimización de la extracción de biocidas en muestras de agua de mar mediante SPE

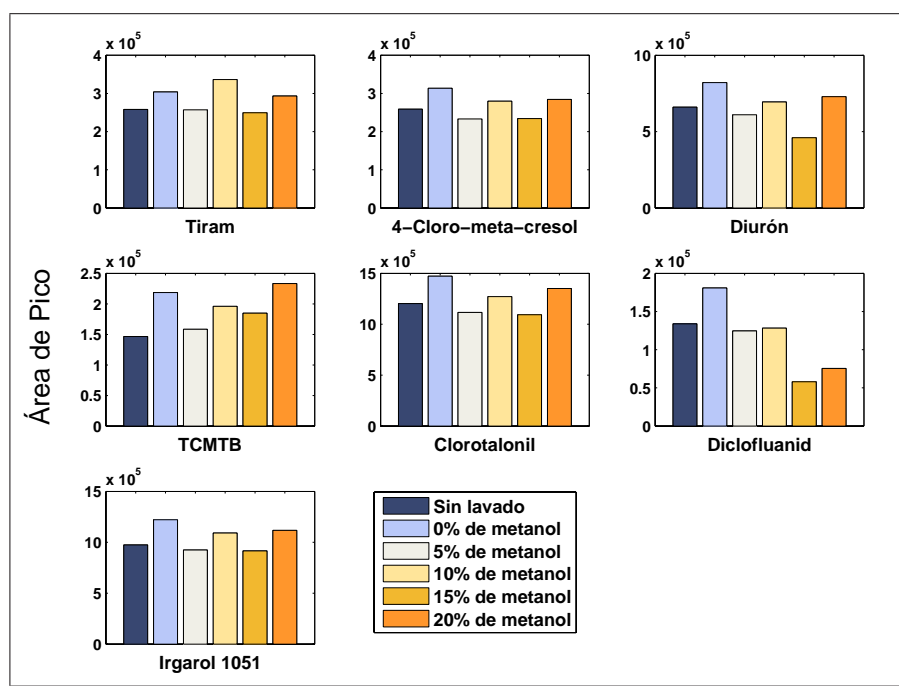


Figura 8.2.- Áreas obtenidas mediante el empleo de diferentes composiciones del disolvente de lavado (media de dos determinaciones).

se observa en la gráfica 8.2 que todos los compuestos muestran áreas similares independientemente de la composición del disolvente de lavado, excepto el Diclofluánid, que muestra una disminución apreciable a medida que se aumenta el porcentaje del disolvente orgánico.

Como disolvente en el paso de lavado se optó por agua Milli-Q, ya que fundamentalmente nos interesa eliminar las diferentes sales retenidas, además los extractos obtenidos no presentan un número apreciable de interferencias, por lo que el empleo de diferentes mezclas de metanol y agua puede ser, aparte de un perjuicio en la determinación de Diclofluánid, una tarea innecesaria. El volumen de agua seleccionado fue de 10 mL ( $2 \times 5$  mL).

### Volumen de elución

El volumen de elución es un factor que debe ser minimizado en la medida de lo posible sin comprometer las recuperaciones de los diversos compuestos en análisis. Con diversos materiales poliméricos y de fases sólidas convencionales como C<sub>18</sub>, es frecuente que bajos volúmenes de disolventes orgánicos consigan extraer los analitos de interés, mientras que otros materiales como el carbón grafitado, necesitan de un mayor volumen para conseguir una extracción efectiva [84].

El disolvente seleccionado fue el metanol; éste ha sido anteriormente empleado para la elución de parte de los compuestos objeto de estudio en fases sólidas similares [75], además, es compatible con el sistema de determinación (cromatografía líquida) por lo que no es necesario llevar el extracto a total sequedad y redissolver en otro disolvente.

Para poder conocer el volumen óptimo de disolvente, primero se llevó a cabo un ensayo con diferentes muestras de agua de mar (100 mL) enriquecidas con la misma cantidad de la mezcla de los siete analitos, eluyéndose con 1×2.5 mL y 2×2.5mL de metanol. Con el fin de poder comparar los resultados (figura 8.3), se normalizaron los datos multiplicando las áreas obtenidas por el volumen empleado. Como se puede observar en este primer ensayo, un volumen de 2.5 mL fue igual de eficaz en la extracción de los analitos que un volumen de 5 mL, por lo que se planteó reducir aún más dicho volumen, con el fin de evitar cualquier paso de evaporación que prolongaría de forma importante el tiempo de análisis.

En la figura 8.4 se muestran los resultados normalizados obtenidos (área de pico × volumen de eluato) para los diferentes compuestos objeto de estudio y para volúmenes comprendidos entre 1 mL y 8 mL. Como se puede observar no se aprecia una disminución importante del área a medida que se disminuye el volumen de

## 8. Optimización de la extracción de biocidas en muestras de agua de mar mediante SPE

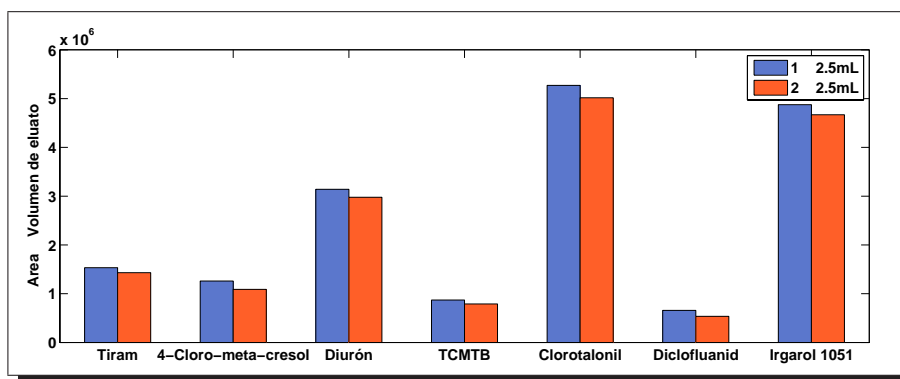


Figura 8.3 .- Áreas obtenidas mediante el empleo de diferentes volúmenes de eluato (1×2.5 mL y 2×2.5 mL, media de dos determinaciones).

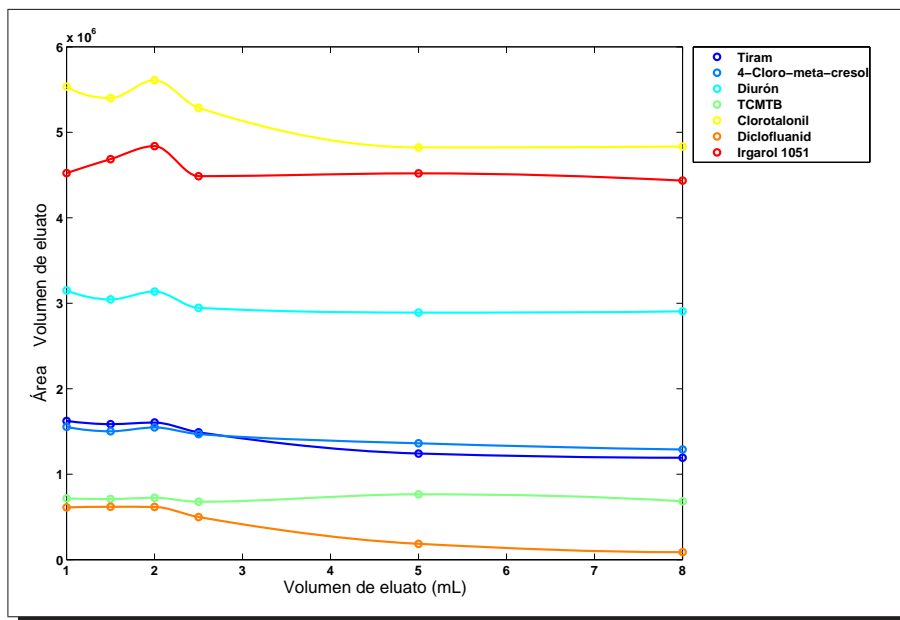


Figura 8.4 .- Áreas obtenidas mediante el empleo de diferentes volúmenes de eluato (1-8 mL, media de dos determinaciones).

elución, lo que significa que las recuperaciones de los diferentes compuestos no se ven afectadas por emplear un volumen de elución bajo. Este hecho evita el empleo de un paso posterior de evaporación, donde es posible que se produzcan

pérdidas importantes de determinados compuestos, por ejemplo, otros autores achacan las bajas recuperaciones obtenidas para el Diclofluanid a la evaporación del extracto [92]. Basándonos en estos resultados se escogió un volumen de 1 mL de metanol como el volumen de elución más adecuado para nuestros propósitos.

### Volumen de muestra

El volumen de muestra es otro de los parámetros fundamentales en la extracción en fase sólida, aún más teniendo en cuenta nuestro propósito de obtener una alta preconcentración. Nos interesa conocer si bajo el volumen de muestra que pretendemos utilizar, se ven comprometidas las recuperaciones de los diferentes analitos (*volumen de ruptura*). Para determinar el volumen de ruptura de forma experimental se han revisado diferentes alternativas [131], siendo una de ellas el empleo de volúmenes crecientes de muestra enriquecida con la misma cantidad de analitos en estudio.

Para llevar a cabo este ensayo, se emplearon diferentes volúmenes de agua de mar (100, 500, 800 y 1000 mL) enriquecidos con 15  $\mu\text{g}$  de Diclofluanid y 5  $\mu\text{g}$  de cada uno de los restantes analitos. Los resultados se muestran en la figura 8.5.

Como puede observarse en dicha figura, las recuperaciones (expresadas como áreas de pico) son similares para los diferentes volúmenes y para cada compuesto, menos en el caso del 4-Cloro-meta-cresol, el cuál muestra un aumento de área con el volumen de muestra. Este hecho puede deberse a una mayor capacidad de retención por parte de la fase estacionaria al encontrarse dicho analito menos concentrado.

Un volumen de muestra de 1000 mL fue seleccionado como el más adecuado para nuestros estudios, ya que nos permite obtener una alta preconcentración y

## 8. Optimización de la extracción de biocidas en muestras de agua de mar mediante SPE

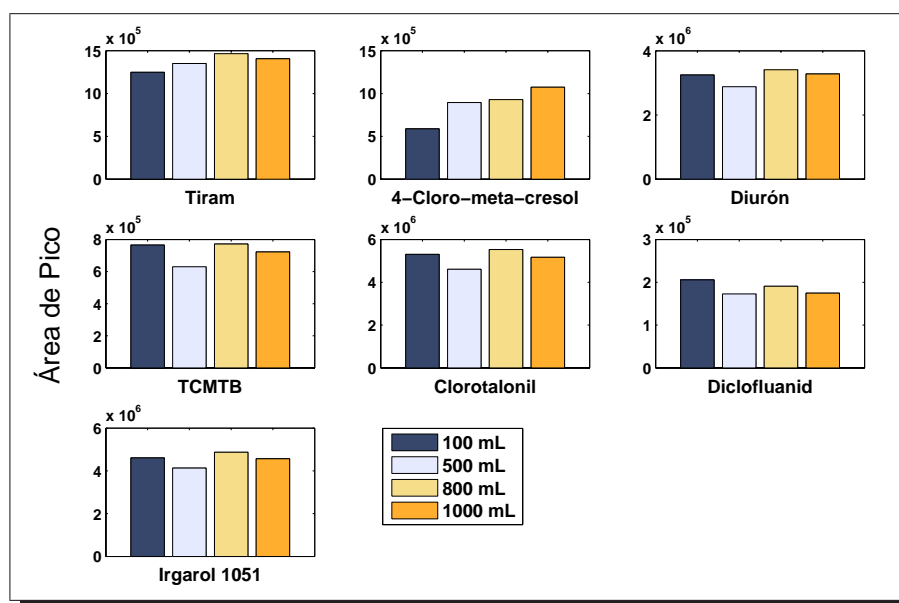


Figura 8.5.- Optimización del volumen de muestra (media de dos determinaciones).

por lo tanto menores límites de detección.

## 8.2. Parámetros analíticos y validación

### Análisis cromatográfico mediante HPLC-DAD

Para llevar a cabo el análisis cromatográfico se inyectó en el sistema  $30 \mu\text{L}$  de cada extracto, haciendo uso de una columna  $\text{C}_{18}$  de 150 mm de largo y 4.6 mm de diámetro, además se midió el área de pico de cada analito al tiempo de retención previamente establecido en la separación cromatográfica y a la longitud de onda máxima de cada compuesto, ambos parámetros se muestran en la tabla 8.1.

El cromatograma obtenido para una muestra de agua de mar (100 mL) enriquecida con la mezcla de los siete compuestos en estudio ( $15 \mu\text{g/L}$  para Diclofluanid y  $5 \mu\text{g/L}$  para el resto), a la cuál se le aplicó el proceso de extracción



## 8.2. Parámetros analíticos y validación

**Tabla 8.1** .- Tiempos de retención y longitudes de onda empleadas en la determinación de los diferentes biocidas mediante HPLC-DAD.

<i>Compuesto</i>	$T_R$ (min) <sup>a</sup>	$\lambda_{abs.}$ (nm) <sup>b</sup>
<i>Tiram</i>	3.3	260
<i>4-Cloro-meta-cresol</i>	6.7	280
<i>Diurón</i>	7.1	248
<i>TCMTB</i>	8.9	280
<i>Clorotalonil</i>	10.3	230
<i>Diclofluanid</i>	11.2	230
<i>Irgarol 1051</i>	12.4	230

<sup>a</sup>Tiempo de retención.

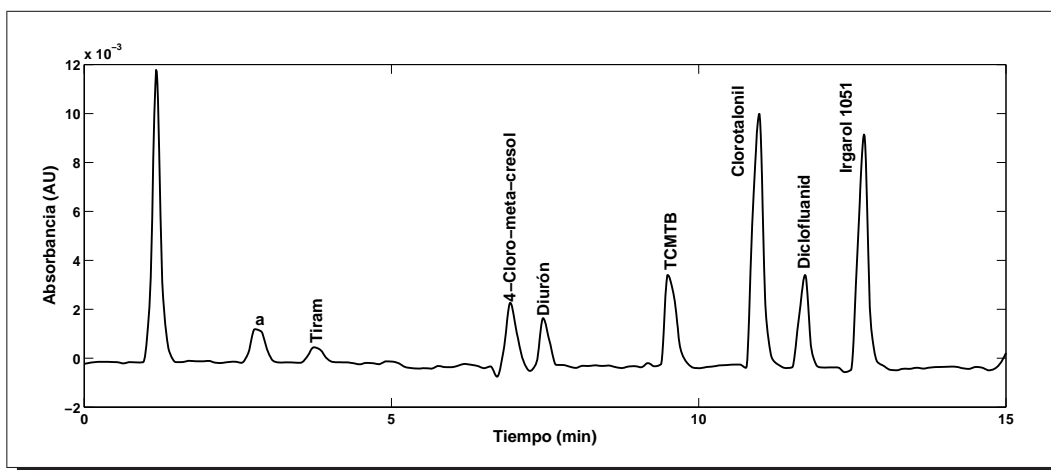
<sup>b</sup>Longitud de absorbanza máxima.

optimizado, se muestra en la figura 8.6. En el cromatograma además aparece otro pico (a) que corresponde a un producto de degradación del Diclofluanid, probablemente se trate de DMSA (*N'*-dimethyl-*N*-phenyl-sulphonamide), su principal producto de degradación. El Diclofluanid se muestra inestable en medios alcalinos como el agua de mar, descomponiéndose rápidamente [46,98]. Por otra parte, en este mismo cromatograma se puede apreciar una separación adecuada de los diferentes analitos, así como, línea base estable sin interferencias apreciables de la matriz.

### Parámetros analíticos

Los parámetros analíticos de la metodología optimizada se muestran en la tabla 8.2. La linealidad fue evaluada sobre muestras de agua de mar enriquecidas con la mezcla de los diferentes biocidas. En todos los casos, valores del coeficiente

## 8. Optimización de la extracción de biocidas en muestras de agua de mar mediante SPE



**Figura 8.6** .- Cromatograma de una muestra de agua de mar enriquecida con la mezcla de los siete biocidas en estudio. El pico "a" corresponde a un producto de degradación del Diclofluanid.

de regresión superiores a 0.995 fueron obtenidos para el ajuste lineal por mínimos cuadrados. Sólo el Diclofluanid mostró un valor inferior ( $R^2=0.992$ ).

Tanto la recuperación como la reproducibilidad fueron evaluadas mediante el análisis de seis muestras enriquecidas con la misma concentración de la mezcla de los siete analitos (2000 ng/L para el Diclofluanid y 500 ng/L para el resto). Como se puede observar, las recuperaciones son superiores al 80 %, con desviaciones estándar relativas inferiores al 7 %, exceptuando al Diclofluanid, que muestra valores de 67.7 % y 10.8 % respectivamente.

Los límites de detección, calculados basándonos en una relación señal/ruido de 3 [157], oscilan entre 7 y 75 ng/L, excepto para el Diclofluanid que muestra una baja absorbancia. Estos límites, aunque no alcanzan los niveles de otras detecciones más sofisticadas, son aceptables para determinar la presencia de parte de los biocidas en agua de mar. En los estudios realizados en otras áreas de la

## 8.2. Parámetros analíticos y validación

Tabla 8.2 .- Parámetros analíticos obtenidos mediante SPE-HPLC.

<i>Compuesto</i>	<i>Intervalo</i> <i>Lineal<sup>a</sup> (ng/L)</i>	<i>Recuperación<sup>b</sup></i> <i>(%)</i>	<i>R.S.D.<sup>b,c</sup></i> <i>(%)</i>	<i>L.O.D.<sup>a,d</sup></i> <i>(ng/L)</i>
<i>Tiram</i>	100-1000	96.3	6.5	21.9
<i>4-Cloro-meta-cresol</i>	100-1000	103.0	5.4	74.8
<i>Diurón</i>	50-1000	100.5	3.5	37.5
<i>TCMTB</i>	100-800	84.6	4.7	7.4
<i>Clorotalonil</i>	100-800	92.2	5.9	9.5
<i>Diclofluanid</i>	800-4000	67.7	10.8	415.4
<i>Irgarol 1051</i>	50-1000	92.9	3.8	31.3

<sup>a</sup>factor de preconcentración: 1000.

<sup>b</sup>n=6.

<sup>c</sup>Desviación estándar relativa.

<sup>d</sup>Límite de detección.

costa española se han determinado concentraciones por encima de 100 ng/L de Irgarol 1051 y Diurón, habiéndose utilizado en la determinación de este último la detección por absorbancia UV-visible [158]. En otros estudios también se ha empleado este tipo de detectores con el mismo fin [57, 91].

### Validación

Para validar la metodología optimizada se empleó, a falta de muestras certificadas de referencia y de métodos oficiales para la determinación de los compuestos en estudio en muestras de agua de mar, otra técnica de extracción (LLE) utilizada por otros autores para la determinación de parte de los biocidas en estudio [123, 126]. El procedimiento consiste en una extracción líquido-líquido

## 8. Optimización de la extracción de biocidas en muestras de agua de mar mediante SPE

---

empleando el diclorometano como extractante, habiéndose especificado en detalle en el apartado 6.6.

Varias muestras de agua de mar (1000 mL) fueron enriquecidas con la misma concentración de la mezcla de analitos (2400 ng/L para Diclofluanid y 600 ng/L para el resto) con el fin de realizar ambas extracciones (SPE y LLE), realizándose dichos análisis por duplicado. Los resultados para el Diurón, Clorotalonil, Diclofluanid e Irgarol 1051 se muestran en la figura 8.7. La extracción líquido-líquido no reportó datos ni de Tiram ni de TCMTB, mientras que los valores obtenidos para el 4-Cloro-meta-cresol mostraron una alta desviación (>25 %).

Tanto en el caso del Irgarol 1051 como en del Clorotalonil, la extracción líquido-líquido reportó recuperaciones superiores al 90 %, aunque los resultados obtenidos mediante la extracción en fase sólida fueron superiores. Por otro lado, la extracción líquido-líquido del Diurón y Diclofluanid presentó recuperaciones sustancialmente inferiores a las obtenidas mediante SPE. En todos los casos, la desviación en la medida cometida en la extracción líquido-líquido fue mayor que la obtenida en la extracción en fase sólida.

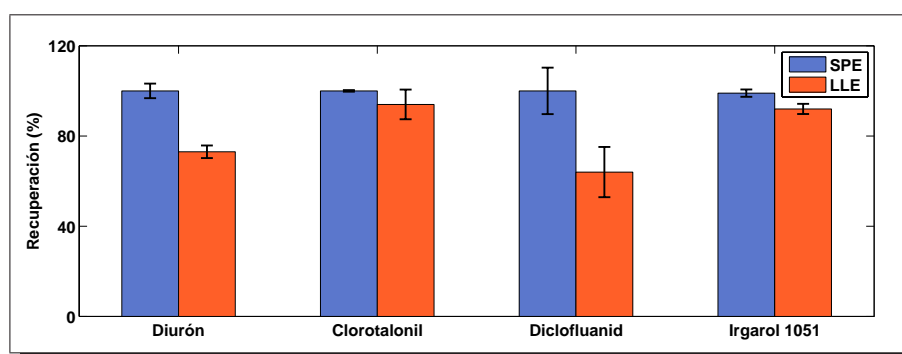


Figura 8.7.- Comparación entre LLE y SPE (media de dos determinaciones).

### 8.3. Determinación mediante LC-MS/MS

Una vez se pudo disponer de un sistema cromatográfico con detector de masas de triple cuadrupol, o se migró la metodología hacia esta técnica, ya que, como es bien sabido, muestra una serie de ventajas a la hora de cuantificar y cualificar que la hacen idónea para el análisis de muestras reales.

Se trabajó siempre en modo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*<sup>1</sup>), ya que es el modo de trabajo que aporta una mayor sensibilidad y selectividad. Pero antes de empezar a emplear esta técnica, fue necesario optimizar todas las condiciones inherentes a la detección; iones precursores, iones producto, voltajes de capilar, energías de colisión y temperatura del gas de secado, además de las condiciones propias de la separación cromatográfica. Una vez optimizada la parte instrumental de la técnica se procedió a la determinación de los parámetros analíticos de la metodología SPE-LC-MS/MS.

Debido a las características técnicas del aparato disponible, no fue posible determinar ni el Clorotalonil ni el 4-Cloro-meta-cresol, ya que ambos muestran una baja ionización mediante el uso de la interfase empleada (ESI, *Electrospray Ionization*); además, tampoco pudo determinarse el Tiram, ya que sufre una rápida hidrólisis que se ve favorecida en condiciones ácidas existentes en la fase móvil empleada [38] (agua tamponada con 0.2% de ácido fórmico y 5 mM formiato amónico, pH $\approx$ 4.4).

---

<sup>1</sup>Determinación de iones productos procedentes de la fragmentación de un ion precursor en la celda de colisión.

### Optimización

Como se detalló en apartado 6.2, la determinación de los valores óptimos de los parámetros inherentes a la determinación se realizaron mediante infusión directa de disoluciones individuales de cada patrón en el detector. Aunque se evaluó la ionización en modo positivo (PI) y negativo (NI), se observó, bajo las condiciones existentes, mejores señales para todos los compuestos en PI. Para el Diurón e Irgarol 1051 la bibliografía confirma esta observación, pero en los casos del Diclofluánid y TCMTB es más frecuente su determinación en NI [84,106], aunque existen también referencias que afirman lo contrario para el TCMTB [102].

El principal ion precursor para el Diurón fue el 233  $[M+H]^+$ , obteniéndose como principal ion producto  $m/z$  72  $[MH-C_6H_5Cl_2N]^+$  [101] y seleccionando inicialmente como ion secundario  $m/z$  160. Este último ion producto, ha sido empleado por otros autores en la determinación de Diurón mediante LC-MS/MS en muestras de agua de mar [60], pero en nuestro caso muestra una abundancia relativa respecto del primer ion producto inferior al 10%. Debido a la escasez de iones producto que muestra la fragmentación del ion  $m/z$  233, varios autores han empleado la relación isotópica  $^{35}Cl/^{37}Cl$ ; mediante el uso de una transición ( $233 \Rightarrow 72$ ) con fines cuantitativos y otra ( $235 \Rightarrow 72$ ) con fines cualitativos, es posible determinar la presencia de este compuesto en muestras reales [159]. También ha sido frecuente el empleo de  $m/z$  46 como ion de confirmación [58]. Posteriormente, con el fin de mejorar la confirmación del Diurón en muestras reales, se evaluó la presencia de iones producto inferiores a  $m/z$  50 en busca de mejores relaciones de abundancia relativa. Se obtuvo que  $m/z$  46 cumplía con estos objetivos, aunque la abundancia relativa seguía siendo inferior al 20%.

Para el Irgarol 1051, el principal ion precursor obtenido fue  $m/z$  254  $[M+H]^+$ ,

### 8.3. Determinación mediante LC-MS/MS

---

escogiéndose como ion de cuantificación el ion producto  $m/z$  198  $[\text{MH-C}_4\text{H}_8]^+$  [101, 102] y como ion de confirmación  $m/z$  91.

En el caso del Diclofluanid, se observó la presencia de tres iones precursores. A bajos voltajes de capilar (52 V), se vio favorecida la presencia de  $m/z$  333  $[\text{M+H}]^+$ , y en menor medida de  $m/z$  350  $[\text{M+NH}_4]^+$ , mientras que a voltajes superiores (84 V) el ion predominante fue  $m/z$  224  $[\text{M-SO}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2]^+$ . Los iones productos obtenidos a partir del ion precursor  $m/z$  333 fueron;  $m/z$  123  $[\text{PhNS}]^+$  y el propio  $m/z$  224, mientras que, cuando el ion precursor empleado fue el  $m/z$  224 el único ion producto obtenido fue  $m/z$  123. Con el fin de aumentar la señal obtenida para el ion de cuantificación ( $m/z$  123), y por lo tanto disminuir los límites de detección, se hizo uso de dos transiciones ( $333 \Rightarrow 123$  y  $224 \Rightarrow 123$ ). El ion producto  $m/z$  224 obtenido a partir del ion precursor  $m/z$  333 se empleó en la confirmación. Alguno de estos iones ya ha sido empleado con anterioridad en la determinación de Diclofluanid en muestras de agua de mar [92].

Para el TCMTB, el principal ion precursor obtenido fue  $m/z$  239  $[\text{M+H}]^+$ , siendo los iones producto seleccionados como ion de cuantificación y de confirmación  $m/z$  180  $[\text{M-SCN}]^+$  [102] y  $m/z$  136  $[\text{MH-SCH}_2\text{SCN}]^+$  respectivamente.

Aunque en el caso del TCMTB y Diclofluanid parte de los iones aquí referenciados no han sido descritos anteriormente mediante LC-MS, sí se han identificado mediante cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas con cuadrupolos (GC-MS/MS) e ionización por impacto electrónico [70].

En la tabla 8.3 se muestran los diferentes iones precursores seleccionados, los voltajes de capilar óptimos, los iones de cuantificación y confirmación, las energías de colisión y las abundancia relativas.

## 8. Optimización de la extracción de biocidas en muestras de agua de mar mediante SPE

**Tabla 8.3 .-** Condiciones óptimas para la determinación de los analitos mediante MS/MS.

<i>Compuesto</i>	<i>M<sup>a</sup></i>	<i>Precursor</i>	<i>Capilar<sup>b</sup></i> (V)	<i>Cuantificación</i> (Coll. eV) <sup>c</sup>	<i>Confirmación</i> (Coll. eV) <sup>c</sup>	<i>R.A.<sup>d</sup></i> (%)
<i>Diurón</i>	232	233	52	72 (16)	46 (9.5)	13 (30)
<i>TCMTB</i>	238	239	30	180 (10)	136 (22)	41 (25)
<i>Irgarol 1051</i>	253	254	40	198 (11.5)	91 (22)	29 (25)
<i>Diclofluanid</i>	332	333	52	123 (22.5)	224 (9.5)	39 (25)
		224	84	123(12.5)		

<sup>a</sup>Masa molecular.

<sup>b</sup>Voltaje de capilar.

<sup>c</sup>Energía de colisión entre paréntesis.

<sup>d</sup>Abundancia relativa (relación entre ion de cuantificación e ion de confirmación); entre paréntesis se muestra la tolerancia máxima permitida según la Directiva 2002/657 EC [160].

Aparte de estos parámetros, también se evaluó la influencia del gas de secado sobre los diferentes iones precursores seleccionados. En la mayoría de los casos, un aumento en la temperatura del gas de secado (N<sub>2</sub>) conlleva un aumento en la señal de los mismos, pero las elevadas temperaturas pueden provocar que determinados iones se fragmenten con la consecuente pérdida de señal. Este fenómeno se puede observar en la figura 8.8, donde dos iones procedentes de la ionización del Diclofluanid se monitorizaron a la vez que se elevaba la temperatura de 150 a 400°C. Para evitar esta pérdida de señal se optó por mantener la temperatura del gas de secado a 250°C.

Como se explicó en el apartado 4.1, para la elución cromatográfica de los cuatro biocidas en estudio se empleó una columna C<sub>18</sub> de 2.4 μm de tamaño de partícula con 50 mm de largo y 2 mm de diámetro, diseñada para obtener una



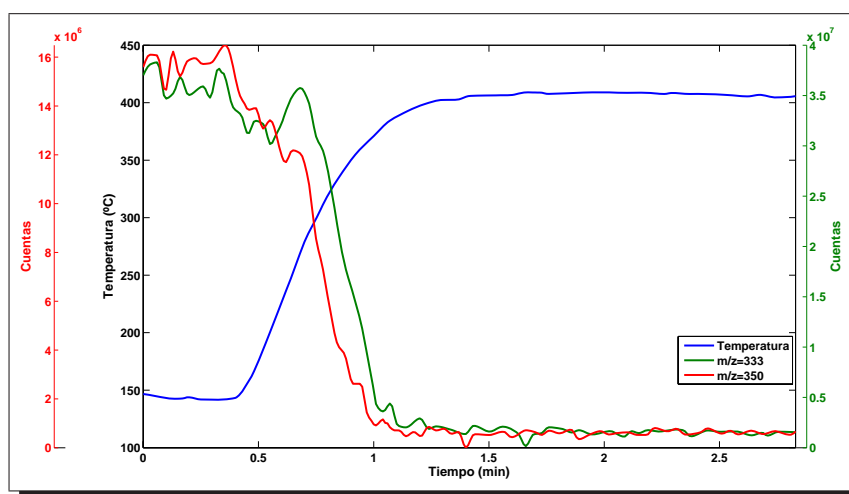


Figura 8.8.- Influencia de la temperatura sobre la abundancia de varios iones precursores del Diclofluánid.

rápida resolución sin necesidad de alcanzar altas presiones. Mediante su empleo, la separación cromatográfica fue efectiva antes de los cinco minutos haciendo uso de un programa isocrático a un flujo de 0.2 mL.

En la figura 8.9 se muestra un cromatograma de todos los iones presentes (*Total Ion Current*, TIC) y los iones de cuantificación y confirmación de cada uno de los compuestos, obtenidos a partir de una muestra enriquecida con la mezcla de los cuatro biocidas (10 ng/L) a la cuál se le aplicó el proceso de SPE previamente optimizado.

### Parámetros analíticos

La linealidad del método se evaluó en el intervalo de 2.5 a 700 ng/L sobre muestras de agua de mar enriquecidas con la mezcla de los diferentes biocidas; en todos los casos, coeficientes de correlación superiores a 0.995 fueron obtenidos.

Los parámetros analíticos fueron evaluados a tres diferentes niveles de

## 8. Optimización de la extracción de biocidas en muestras de agua de mar mediante SPE

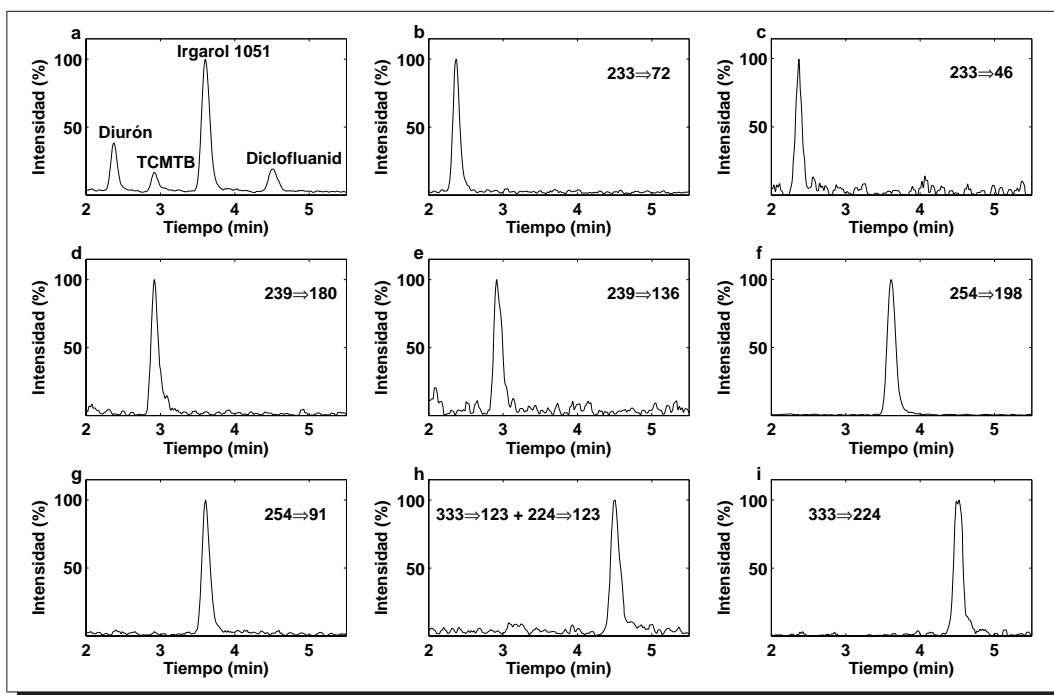


Figura 8.9.- Cromatograma obtenido mediante SPE-LC-MS/MS en modo MRM de una muestra de agua de mar enriquecida (10 ng/L), *a*: cromatograma TIC, *b* y *c*: iones de cuantificación y confirmación para el Diurón, *d* y *e*: iones de cuantificación y confirmación para el TCMTB, *f* y *g*: iones de cuantificación y confirmación para el Irgarol 1051, *h* e *i*: iones de cuantificación y confirmación para el Diclofluanid.

concentración (500, 50 y 5 ng/L). Para ello se utilizaron seis muestras enriquecidas a cada nivel, a las cuáles se les aplicó el procedimiento SPE-LC-MS/MS. Los resultados se muestran en la tabla 8.4. El límite de detección y cuantificación de cada compuesto se calculó en función a una relación señal/ruido igual a 3 y 10 respectivamente [157].

Las recuperaciones y desviaciones estándar relativas obtenidas a 500 ng/L (nivel evaluado también mediante HPLC-DAD, apartado 8.2), fueron similares a

### 8.3. Determinación mediante LC-MS/MS

Tabla 8.4 .- Parámetros analíticos obtenidos mediante SPE-LC-MS/MS.

<i>Compuesto</i>	<i>500 ng/L</i>		<i>50 ng/L</i>		<i>5 ng/L</i>		<i>L.O.D.<sup>c</sup></i>	<i>L.O.Q.<sup>d</sup></i>
	<i>Recup.<sup>a</sup></i>	<i>R.S.D.<sup>b</sup></i>	<i>Recup.<sup>a</sup></i>	<i>R.S.D.<sup>b</sup></i>	<i>Recup.<sup>a</sup></i>	<i>R.S.D.<sup>b</sup></i>		
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)		
<i>Diurón</i>	100.6	3.3	88.0	4.6	83.7	4.2	0.1	0.4
<i>TCMTB</i>	91.0	3.4	93.4	6.8	79.3	6.8	0.2	0.5
<i>Irgarol 1051</i>	86.1	4.0	84.9	5.2	78.9	2.5	0.1	0.3
<i>Diclofluanid</i>	84.0	5.7	72.8	8.3	81.8	6.0	0.1	0.3

<sup>a</sup>Recuperación (n=6).

<sup>b</sup>Desviación estándar relativa (n=6).

<sup>c</sup>Límite de detección. (S/N=3).

<sup>d</sup>Límite de cuantificación. (S/N=10).

las reportadas por HPLC-DAD, salvo en el caso del Diclofluanid, donde se mejoró de forma apreciable la cuantificación. En lo que respecta a los niveles inferiores evaluados, las recuperaciones decrecieron levemente pero manteniéndose siempre por encima del 72 %, mientras que las desviaciones fueron siempre inferiores al 9 %. Los límites de detección obtenidos se encuentran en torno a dos órdenes de magnitud por debajo de los encontrados en la determinación por HPLC-DAD.

La sensibilidad que aporta la determinación por LC-MS/MS en modo MRM hacen de esta técnica instrumental una herramienta fundamental en análisis medioambiental, habiéndose conseguido mediante su empleo uno de los objetivos de partida, el establecimiento de una metodología analítica lo suficientemente sensible para la determinación de los biocidas en estudio en muestras reales.

## Capítulo 9

### *Determinación de biocidas en muestras de agua de mar*

La determinación de los biocidas en estudio en muestras de agua de mar se llevó a cabo en el periodo comprendido entre mayo de 2007 y mayo de 2009. Desde mayo de 2007 a marzo de 2008, los análisis se realizaron mediante HPLC-DAD, mientras que a partir de mayo de 2008 se empleó el sistema LC-MS/MS para este fin.

Durante el primer periodo de muestreo se pudo constatar la presencia asidua de Diurón, mientras que otros compuestos, como el Irgarol 1051 y Clorotalonil se hallaron de forma esporádica. Debido a que los niveles de los diversos biocidas en las muestras de agua de mar se encontraron, en muchos casos, en concentraciones inferiores a los límites de detección aportados por la determinación mediante HPLC-DAD (tabla 8.2), el conjunto de datos correspondiente a este primer periodo de muestreo reducido, por lo que sólo es posible realizar una discusión desde el punto de vista descriptivo.

A partir de mayo de 2008 y haciendo uso del sistema cromatográfico

LC-MS/MS, se obtuvo una mayor base de datos de concentración de Diurón e Irgarol 1051, pudiéndose llevar a cabo un análisis estadístico más completo. Además, el mismo conjunto de datos se empleó para realizar una evaluación probabilística del riesgo ecológico.

A la hora de determinar la presencia de los compuestos objeto de estudio en las muestras analizadas, se tomaron diversas medidas que nos permitieron confirmar dicha presencia. Mediante el empleo del sistema cromatográfico HPLC-DAD, aparte del uso de los tiempos de retención, se comparó el espectro de absorbancia obtenido en cada muestra con el estándar comercial. Con el empleo del sistema LC-MS/MS se pudo realizar una confirmación más exigente, se hizo uso de los tiempos de retención, dos iones producto y la relación de abundancia entre los mismos con un porcentaje de incertidumbre marcado por la Directiva 2002/657 [160]. Cada día de trabajo se actualizaron dichas relaciones de abundancia relativa a partir de disoluciones de los patrones de referencia.

### 9.1. Análisis mediante HPLC-DAD

Los resultados obtenidos para las diferentes muestras analizadas mediante HPLC-DAD (mayo 2007-marzo 2008) se muestran en la tabla A.1 del anexo A. En dicha tabla se observan valores de concentración para dos de los siete compuestos analizados (Diurón e Irgarol 1051). El resto de los biocidas analizados mediante esta técnica se encontraron, en todas las muestras recolectadas, en concentraciones inferiores al límite de detección, excepto para la muestra C6 de julio de 2007, donde se pudo determinar la presencia de Clorotalonil. Como se argumentó en la Introducción de la presente Tesis Doctoral, nunca se han referenciado, al menos bajo nuestro conocimiento, niveles apreciables de TCMTB, Tiram o

## 9. Determinación de biocidas en muestras de agua de mar

---

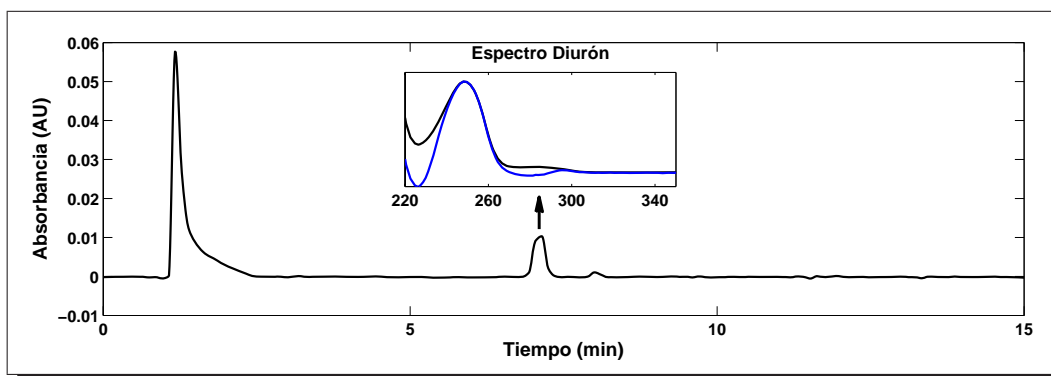
4-Cloro-meta-cresol en muestras de aguas portuarias. En el caso del Diclofluanid su baja solubilidad en agua (tabla 1.7) y rápida degradación en el medio acuático marino [48,98] dificultan la detección del mismo.

### Diurón

El Diurón estuvo presente en el 51.6% de las muestras, en concentraciones superiores al límite de detección de la metodología empleada (37.5 ng/L). La concentración mínima detectada fue de 37.7 ng/L correspondiente al puerto deportivo del Real Club Náutico de Gran Canaria, mientras que la concentración máxima fue de 635 ng/L correspondiente al Muelle Deportivo de Las Palmas de Gran Canaria. En la figura 9.1, se presenta el cromatograma obtenido para dicha muestra. El percentil 90 de los datos corresponde a una concentración 107.6 ng/L, lo que nos indica que valores superiores a esta concentración son esporádicos.

Este mismo compuesto ha sido hallado a niveles muy superiores en el Reino Unido (hasta 6 742 ng/L) [52], Holanda (hasta 1 130 ng/L) [58], Japón (hasta 3 054 ng/L) [91] y otras localidades españolas (hasta 2 190 ng/L) [84], si bien, la mayoría de las referencias citan concentraciones similares a las determinadas en el presente estudio. Por ejemplo, en varios puertos deportivos de la costa oeste de Suecia se han documentado concentraciones entre 10 y 100 ng/L [44], en puertos deportivos, aguas costeras y estuarios del Reino Unido entre 10.5 y 768 ng/L [53], en aguas procedentes del puerto de Osaka entre 4 y 658 ng/L [60], en el Golfo de Nápoles entre 6.2 y 475 ng/L [92] y en la costa mediterránea de España entre 10 y 180 ng/L [68] y entre 5 y 200 ng/L [93]. En otras localizaciones como la costa oeste de Estados Unidos, los niveles hallados de este biocida son muy inferiores, con concentraciones máximas de 12 ng/L y 27 ng/L respectivamente [63,106].

Debido a que este biocida es frecuentemente empleado en tierra como herbicida,



**Figura 9.1** .- Cromatograma correspondiente a la muestra A12 de marzo de 2008. En el cuadro pequeño se puede observar el espectro de absorbancia de la muestra al tiempo de elución del Diurón (negro) y el correspondiente al estándar (azul). ( $\lambda_{abs.} = 248nm$ ).

en algunas ocasiones las concentraciones determinadas en aguas de mar pueden ser producto de la entrada del mismo a partir de los estuarios y escorrentías [59]. Las condiciones en las que se llevó a cabo nuestro muestreo hacen muy improbable este hecho, ya que los diferentes puntos de recolección se localizan lejos de la influencia de vertidos desde tierra, siendo el caudal transferido por los mismos, muy inferior al que se puede dar en áreas continentales fuertemente irrigadas. La fuente principal de este compuesto en las muestras recolectadas es su empleo como biocida en pinturas antiincrustantes.

En la tabla 9.1 se pueden observar los valores mínimos y máximos, medias y diversos parámetros descriptivos sobre los niveles de Diurón encontrados para cada puerto en estudio.

En lo que respecta al puerto comercial de Las Palmas de Gran Canaria (puntos A1-A5, figura 5.1), el 36.7% de las muestras recolectadas mostraron una concentración superior al límite de detección de la metodología empleada. La concentración máxima (191.4 ng/L) corresponde a la muestra A2 de noviembre

## 9. Determinación de biocidas en muestras de agua de mar

**Tabla 9.1** .- Parámetros estadísticos descriptivos de los niveles de Diurón por puerto.  
Análisis realizados mediante HPLC-DAD.

<i>Puerto</i>	<i>Presencia</i> (%) <sup>a</sup>	<i>Min.-Max.</i> (ng/L) <sup>b</sup>	<i>Media</i> (ng/L)	<i>Percentil</i> 90 (ng/L)
<i>Puerto de La Luz</i>	36.7	40.3-191.4	67.9	79.3
<i>Club Náutico</i>	58.3	37.7-384.6	109.5	146.8
<i>Muelle Deportivo</i>	70.0	42.2-635.2	107.4	155.0
<i>Mogán</i>	50.0	39.3-96.7	53.4	68.4
<i>Puerto Rico</i>	41.7	38.3-207.3	63.5	74.9
<i>Arguineguín</i>	66.7	50.5-100.1	65.6	90.8

<sup>a</sup>Porcentaje de muestras con concentraciones superiores al límite de detección respecto al total de recogidas en el puerto en estudio.

<sup>b</sup>Intervalo de concentraciones determinadas.

de 2007, mientras que la mínima detectada (40.3 ng/L) corresponde a la misma ubicación en julio de 2007 y a la muestra A5 de noviembre del mismo año. El punto de recolección A1 se sitúa en las inmediaciones de los astilleros presentes en el puerto, pero este hecho no se traduce en una mayor concentración de Diurón en las muestras de agua de mar. Por otro lado, el punto A5 se sitúa frente a la playa de Las Alcaravanas, encontrándose esta ubicación fuera del área de tránsito de grandes buques, aunque bien es cierto que esta área se emplea para el atraque de veleros y embarcaciones recreativas. En cuanto a la evolución temporal, se observa que de las once muestras con concentraciones superiores al LOD, diez correspondieron al periodo comprendido entre septiembre de 2007 y enero de 2008.

Los dos puertos deportivos ubicados dentro del Puerto de La Luz y Las Palmas de Gran Canaria, presentaron concentraciones medias superiores al resto



de puertos en estudio.

El puerto deportivo del Real Club Náutico de Gran Canaria (puntos A6-A9) mostró un valor promedio de 109.5 ng/L, siendo el percentil 90 de los datos recolectados 146.9 ng/L, detectándose en un 58.3 % de las muestras la presencia de Diurón. Este puerto empezó con su actividad el mes de mayo de 2007, coincidiendo con el comienzo de los muestreos y, aunque en la actualidad la ocupación del puerto ronda el 98 %, en los primeros meses ésta fue muy inferior, reflejándose este hecho en la presencia del biocida en cuestión. Durante los muestreos de mayo y julio de 2007 no se detectó la presencia del mismo, pero a partir del mes de septiembre del mismo año se comenzó a detectar con bastante frecuencia (87.5 % de las muestras). En ese mismo mes se alcanzó en el punto A7 la máxima concentración hallada dentro del puerto (384.6 ng/L).

En el Muelle Deportivo (el puerto deportivo de Las Palmas de Gran Canaria) se observaron concentraciones de hasta 635.2 ng/L (punto A12, marzo de 2008), la concentración más alta determinada en muestras de agua de mar del presente estudio. El valor medio fue de 107.4 ng/L, mientras que, el percentil 90 fue igual a 155.0 ng/L. En cuanto a su evolución temporal, se observa que las mayores concentraciones se encontraron en marzo de 2008, con valores superiores a 100 ng/L para cuatro de las cinco muestras recolectadas.

El número de barcos atracados en un área reducida y la baja circulación de agua respecto a la existente en el puerto comercial, no sólo con una mayor área, sino con mayor profundidad, pueden ser causas que expliquen la mayor incidencia de este compuesto en ambos puertos deportivos, además, como apuntan otros autores, los buques de mayor eslora podrían emplear otro tipo de pinturas [59].

En cuanto a los puertos deportivos del Sur de la isla (Puerto de Mogán y Puerto

## 9. Determinación de biocidas en muestras de agua de mar

---

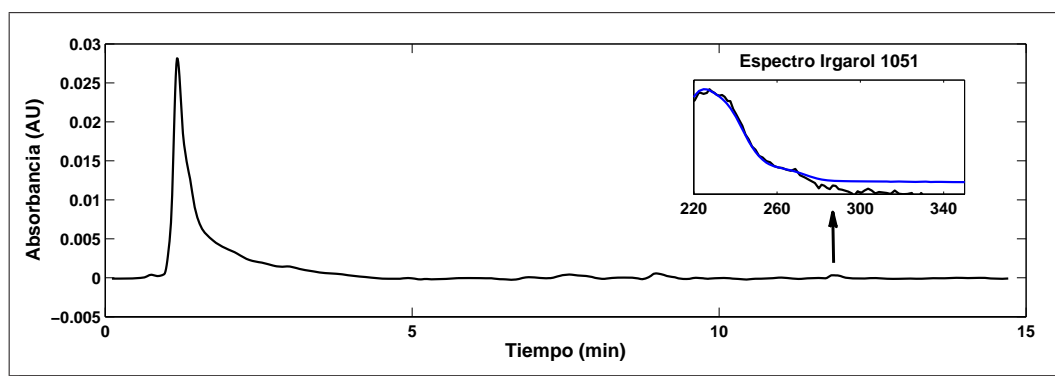
Rico), el porcentaje de muestras con una concentración de Diurón superior al límite de detección de la metodología empleada ronda el 40-50 %, con valores promedios similares al Puerto de Las Palmas de Gran Canaria. Aunque concentraciones de hasta 207.3 ng/L fueron encontradas en el puerto deportivo de Puerto Rico, estos niveles fueron puntales, ya que el percentil 90 del conjunto de muestras recolectadas en dicho puerto es sustancialmente inferior (74.9 ng/L). En cuanto a la evolución temporal, no se observa un patrón claro de comportamiento. En el Puerto de Mogán no se pudo determinar la presencia de Diurón en las muestras de los meses de septiembre y noviembre de 2007, pero las concentraciones halladas en las otras muestras no son muy superiores al límite de detección de la metodología. Por otro lado, las concentraciones halladas en las muestras correspondientes a los meses de enero y marzo de 2008 en el puerto deportivo de Puerto Rico fueron inferiores al límite de detección.

El puerto pesquero de Arguineguín mostró un comportamiento similar a los puertos deportivos de Mogán y de Puerto Rico, con una concentración media de 65.6 ng/L, siendo el valor máximo registrado en este puerto igual a 100.1 ng/L.

### **Irgarol 1051**

La determinación de Irgarol 1051 en las muestras de agua de mar analizadas mediante HPLC-DAD resultó meramente puntual, detectándose sólo en el 5.8 % de las muestras recolectadas, a pesar de ser, como se comentó en la Introducción, uno de los biocidas antiincrustantes más documentados en el medio marino. Este hecho se debe, fundamentalmente, a las bajas concentraciones del mismo en las muestras y la limitación de la técnica empleada de detectar dichos niveles. El valor máximo registrado fue de 56.8 ng/L, mientras que el mínimo fue de 31.7 ng/L. En la figura 9.2 se aprecia el cromatograma donde se observa la presencia del

compuesto junto a su espectro de absorbancia.



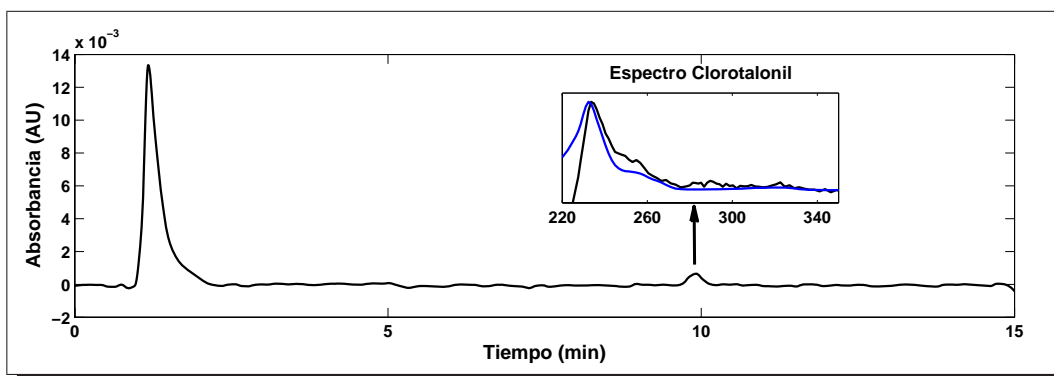
**Figura 9.2** .- Cromatograma correspondiente a la muestra C2 de mayo de 2007. En el cuadro pequeño se puede observar el espectro de absorbancia de la muestra al tiempo de elución del Irgarol (negro) y el correspondiente al estándar (azul). ( $\lambda_{abs.} = 230nm$ ).

La mayoría de las muestras donde se determinó su presencia procedían del puerto deportivo de Puerto Rico (puntos C1-C6) entre los meses de mayo y septiembre de 2007, época estival con mayor actividad náutica y turística. También, se detectó puntualmente en el Muelle Deportivo de Las Palmas de Gran Canaria en el mes de noviembre de 2007 y en el puerto pesquero de Arguineguín en enero de 2008.

### Clorotalonil

El Clorotalonil se detectó de forma esporádica en el punto C6, ubicado en la dársena Puerto Escala del puerto deportivo de Puerto Rico, en el mes de julio de 2007, siendo su concentración igual a 23.5 ng/L (concentración inferior al intervalo de linealidad establecido). En la figura 9.3, se puede observar el cromatograma de dicha muestra junto al espectro de absorbancia del compuesto en estudio.

## 9. Determinación de biocidas en muestras de agua de mar



**Figura 9.3** .- Cromatograma correspondiente a la muestra C6 de julio de 2007. En el cuadro pequeño se puede observar el espectro de absorbancia de la muestra al tiempo de elución del Clorotaloniil (negro) y el correspondiente al estándar (azul). ( $\lambda_{abs.} = 230nm$ ).

Aunque se han realizado estudios donde se incluye el Clorotaloniil entre los biocidas monitorizados en agua de mar [52, 63, 69, 77, 84, 93, 102, 106], no ha sido frecuente su detección. Como comentan otros autores, la causa más plausible para su ausencia es la baja persistencia que muestra en la columna de agua [49]. Esta idea se ve reforzada por el hecho de que, en nuestro muestreo, dicho compuesto sólo se ha podido detectar de forma puntual y a muy bajas concentraciones. Sin embargo, este biocida ha sido detectado en aguas de estuario en el Reino Unido en concentraciones de hasta 1380 ng/L, siendo su empleo en agricultura, en este caso, la principal fuente de entrada al medio [35], y en aguas de diferentes puertos de Grecia a concentraciones de hasta 63 ng/L [99].

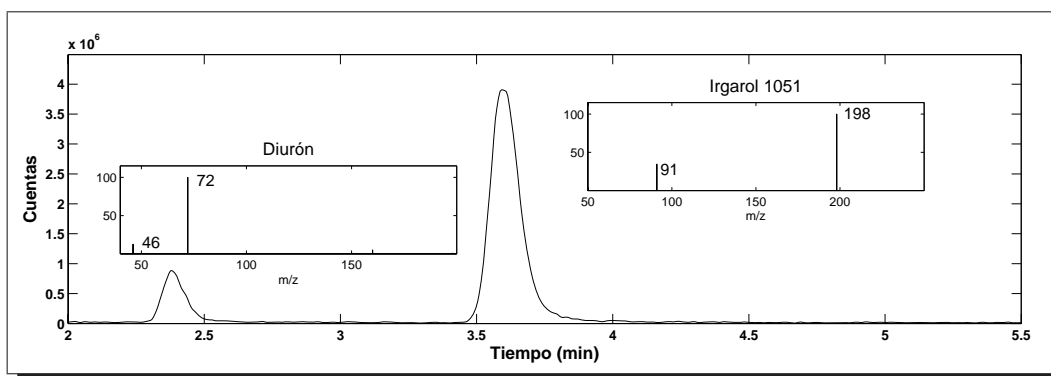
### 9.2. Análisis mediante LC-MS/MS

Durante el periodo mayo 2008 - mayo 2009 se recolectaron 182 muestras, detectándose en el 100% de los casos la presencia de Irgarol 1051 y en el 99.4%

Diurón, presentado la muestra D2 correspondiente al mes de mayo de 2008 la única excepción. En tabla A.2 del anexo A se muestran las concentraciones de ambos compuestos, obtenidas utilizando esta técnica.

La presencia simultánea de Diurón e Irgarol 1051 en todas las muestras es indicativo de que ambos compuestos son ampliamente utilizados en las pinturas antiincrustantes, además de mostrar una alta persistencia en el medio. Las concentraciones del resto de compuestos analizados mediante esta técnica (TCMTB y Diclofluanid) permanecieron siempre inferiores a sus respectivos límites de detección.

En la figura 9.4 se puede observar un cromatograma correspondiente a una muestra tomada en el puerto deportivo del Real Club Náutico de Gran Canaria. En este cromatograma se puede apreciar la presencia de Diurón e Irgarol 1051, además de los iones obtenidos en modo MRM a sus respectivos tiempos de retención.



**Figura 9.4** .- Cromatograma TIC (*Total Ion Current*) correspondiente a la muestra A7 de noviembre de 2008. En los cuadros pequeños se pueden observar los iones presentes a los tiempos de retención del Diurón e Irgarol 1051.

El intervalo de concentraciones de Diurón osciló entre 2.3 ng/L (C3, julio 2008) y 203.6 ng/L (C6, marzo 2008). El percentil 90 de los datos obtenidos corresponde

## 9. Determinación de biocidas en muestras de agua de mar

---

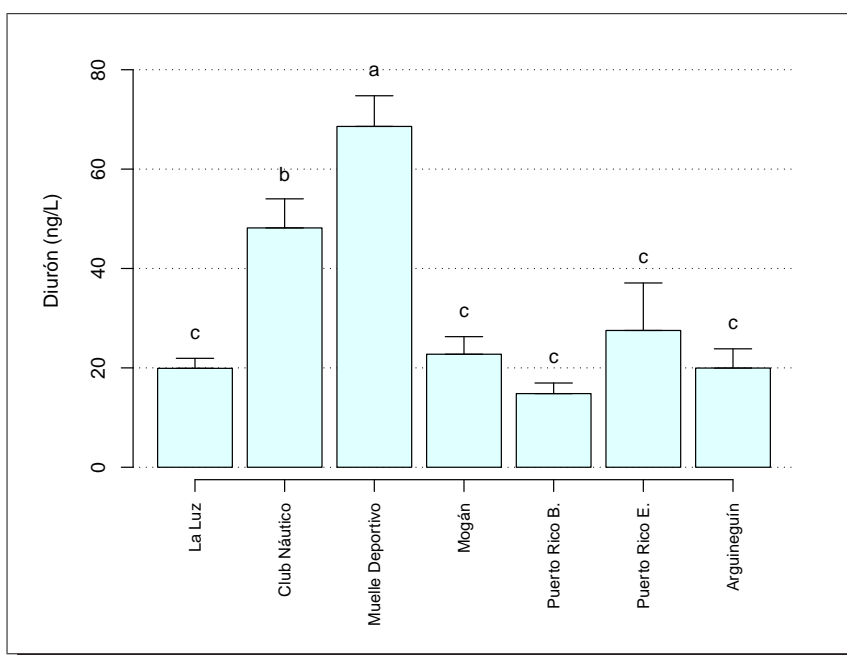
a una concentración de 70.7 ng/L, mientras que el valor medio a 34.5 ng/L.

Aunque, como se comentó anteriormente, concentraciones muy superiores a los valores aquí determinados se han hallado en otras partes del globo, abundan las referencias donde se determinan niveles similares de este compuesto en aguas de Suecia [44], Reino Unido [53], Japón [60], Italia [92] y España [68,93].

En la figura 9.5, se observan los valores promedios de Diurón agrupados por puerto. Debido a que durante los análisis preliminares se observó una diferencia apreciable entre las dos dársenas del puerto deportivo de Puerto Rico (Puerto Base y Puerto Escala), y que además, se encuentran físicamente distanciadas, funcionando cada una como un puerto independiente, se decidió realizar los diversos análisis por separado. Todos los test estadísticos se realizaron con un nivel de significación de 0.05.

El Muelle Deportivo de Las Palmas de Gran Canaria mostró, durante el periodo en estudio, un valor promedio de Diurón significativamente superior (68.6 ng/L) al de resto de puertos, seguido por el otro puerto deportivo presente en Las Palmas de Gran Canaria y perteneciente al Real Club Náutico (48.2 ng/L). Entre los demás puertos en estudio no se pudo observar diferencias significativas de los valores promediados. Las diferencias halladas entre los puertos monitorizados en el periodo mayo 2008-mayo 2009 concuerdan con los indicios aportados por los resultados correspondientes al periodo mayo 2007-marzo 2008 (apartado 9.1).

En los puertos del sur de la isla se observan unos menores niveles de Diurón en sus aguas, a pesar de guardar similitudes con los puertos deportivos presentes en Las Palmas de Gran Canaria en cuanto a número de atraques, ocupación y diseño. Este hecho puede significar el empleo de diferentes formulaciones de pinturas. Los valores promedio de Diurón en los puertos muestreados en el sur de la isla son



**Figura 9.5 .-** Comparación de valores promedios de Diurón por puerto (*a es significativamente mayor que el resto de puertos y b mayor que c*). Las columnas representan los valores medios, mientras que las barras de error los errores estándares ( $\frac{s}{\sqrt{n}}$ , donde  $s$ =desviación estándar y  $n$ =número de determinaciones).

inferiores a 20 ng/L, salvo en el caso del Puerto Escala del puerto deportivo de Puerto Rico, que mostró una concentración media de 27.5 ng/L. Este valor puede ser achacable a la presencia esporádica de concentraciones superiores a 200 ng/L que repercuten directamente en la desviación de las muestras (43.8 ng/L).

En cuanto al Puerto comercial de Las Palmas de Gran Canaria (Puerto de La Luz), la concentración promedio de Diurón hallada es similar a las encontradas en el sur de la isla. Al tratarse de un puerto comercial, el volumen de agua donde se dispersan los diversos contaminantes es muy superior al que nos podemos encontrar en los puertos deportivos, dando este hecho a entender, que existe un mayor aporte

## 9. Determinación de biocidas en muestras de agua de mar

---

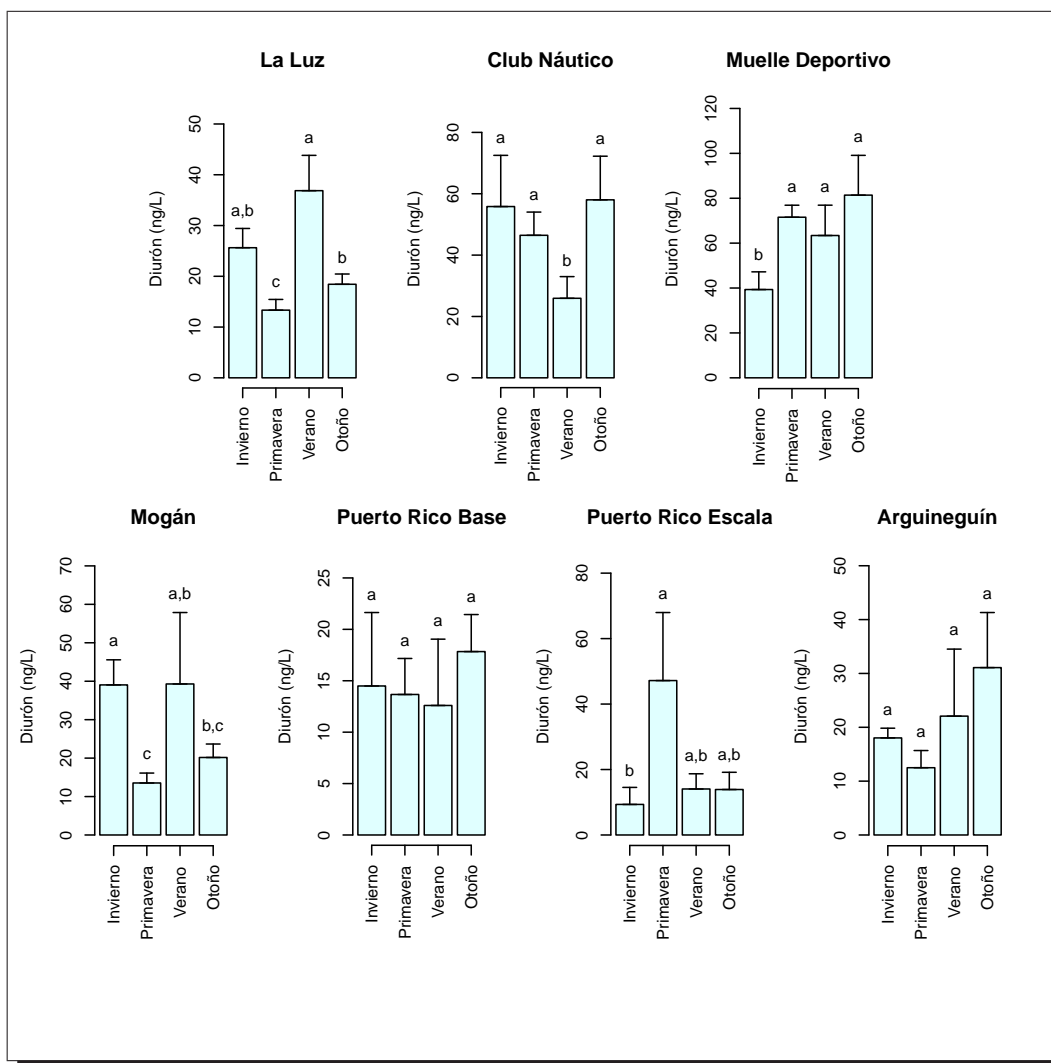
de Diurón a sus aguas, aunque no se puedan apreciar de forma significativa.

En cuanto a la evolución temporal durante el periodo en estudio, la figura 9.6 muestra las concentraciones medias para cada estación por puerto. En el Puerto de La Luz, las mayores concentraciones se alcanzaron en los meses de verano e invierno, mientras que las más bajas correspondieron a la primavera. Los puertos deportivos de Las Palmas de Gran Canaria mostraron concentraciones estables durante gran parte del periodo muestreado, hecho que puede llevar a pensar que en sus instalaciones se mantiene una actividad similar durante gran parte del año. Tan sólo en los meses de verano se pudo apreciar una concentración media de Diurón significativamente menor para el puerto deportivo del Real Club Náutico de Gran Canaria y en los meses de invierno para el Muelle Deportivo.

En los puertos del sur de la isla se observa también una baja variabilidad temporal, no encontrándose diferencias significativas en el Puerto Base de Puerto Rico y en el puerto pesquero de Arguineguín. Algunos autores han observado mayores niveles de Diurón en las aguas de los puertos deportivos durante los periodos de mayor actividad (época estival) [58], pero nuestra localización geográfica favorece que las actividades recreativas a las que se destinan los puertos deportivos puedan prolongarse durante buena parte del año, siendo este hecho una explicación plausible a la evolución temporal de Diurón. Sin embargo, en el puerto de Mogán y en el Puerto Escala de Puerto Rico la diferencias halladas entre las estaciones del año no muestran un patrón de comportamiento fácilmente explicable.

Respecto al Irgarol 1051, los niveles determinados oscilaron entre 2.4 ng/L (A3, mayo 2008) y 146.5 ng/L (C1, julio 2008). El valor promedio observado durante el periodo en estudio fue de 24.8 ng/L, siendo el percentil 90 igual a 49.9 ng/L.





**Figura 9.6 .-** Comparación de valores promedios de Diurón por estación en cada puerto (*a es significativamente mayor que b y b mayor que c*). Las columnas representan los valores medios, mientras que las barras de error los errores estándares ( $\frac{s}{\sqrt{n}}$ , donde *s*=desviación estándar y *n*=número de determinaciones).

Estas concentraciones son similares a las documentadas por otros autores en diversas partes del mundo [57–59, 64, 67]. Sin embargo, otros han referenciado

## 9. Determinación de biocidas en muestras de agua de mar

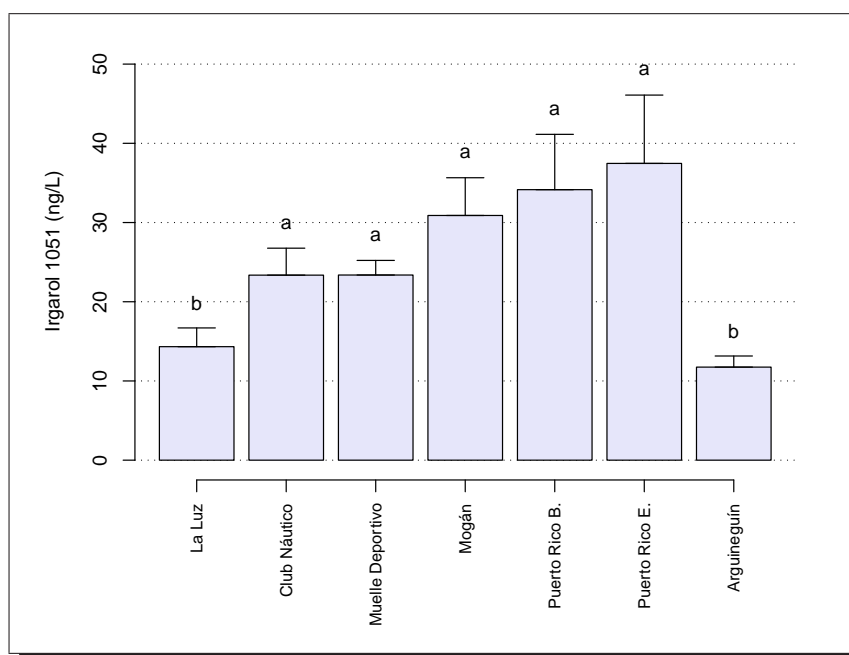
---

concentraciones superiores, por ejemplo, se ha llegado a medir en Francia niveles de hasta 1700 ng/L [43], en el Reino Unido de hasta 1421 ng/L [52], en Alemania de hasta 440 ng/L [56], en Suecia de hasta 400 ng/L [44], en Singapur de hasta 4200 ng/L [61], en Puerto Rico de hasta 1300 ng/L [62], en Estados Unidos de hasta 712 ng/L (California) [63] y en España de hasta 1000 y 450 ng/L en Almería [69,70] y de hasta 325 ng/L en Barcelona [68].

En la figura 9.7 se puede observar la concentración promedio de Irgarol 1051 para cada puerto en estudio, detallándose además, las diferencias entre los mismos a un nivel de confianza del 95 %. Se aprecia la existencia de diferencias significativas entre los puertos deportivos, con mayor concentración promedio, y el resto de puertos en estudio. Varios autores han observado que las altas concentraciones de Irgarol 1051 suelen estar asociadas a este tipo de puertos [41,72,161–163], mientras que, los puertos comerciales, que soportan una menor densidad de embarcaciones, se caracterizan por concentraciones inferiores [41,43,72,123,125,161,163,164].

El puerto de La Luz y el puerto pesquero de Arguineguín presentan una concentración media de 14.3 ng/L y 11.8 ng/L respectivamente, mientras que las concentraciones promedio de los diferentes puertos deportivos son superiores a los 20 ng/L para todos los casos, no pudiéndose apreciar diferencias significativas entre los mismos. El Puerto Escala de Puerto Rico se caracteriza por presentar el nivel medio de Irgarol 1051 más alto (37.5 ng/L) seguido por el Puerto Base (34.2 ng/L) y por el puerto de Mogán (30.9 ng/L). Los puertos deportivos de Las Palmas de Gran Canaria muestran una concentración promedio similar (23.4 ng/L).

Un estudio llevado a cabo en diferentes puertos de Japón, ha revelado elevados niveles de Irgarol 1051 en las aguas de los puertos pesqueros, achacando sus autores estas concentraciones a la alta actividad que presentan este tipo de puertos durante



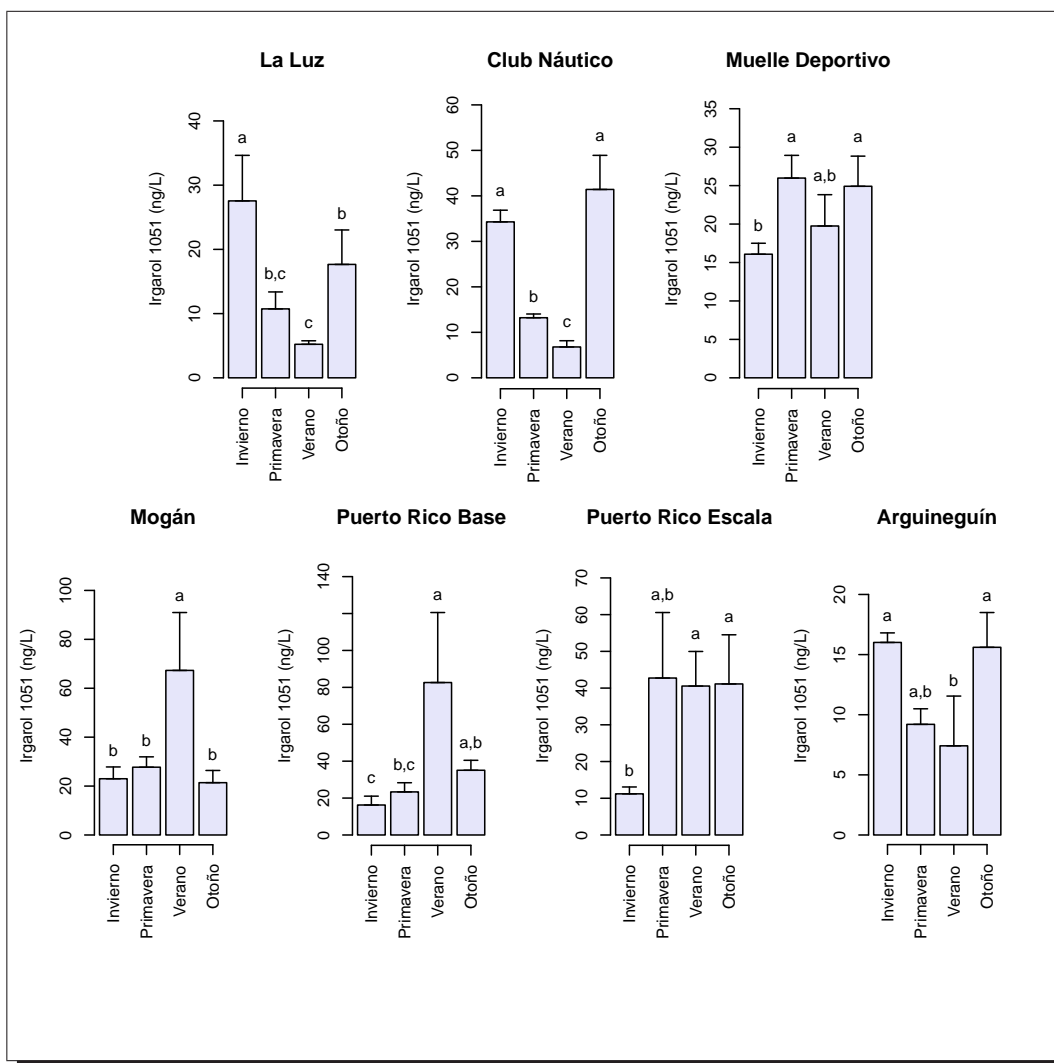
**Figura 9.7 .-** Comparación de valores promedios de Irgarol 1051 por puerto (*a es significativamente mayor que b*). Las columnas representan los valores medios, mientras que las barras de error los errores estándares ( $\frac{s}{\sqrt{n}}$ , donde  $s$ =desviación estándar y  $n$ =número de determinaciones).

todo el año [123], pero en nuestro caso, el puerto pesquero muestreado, es un puerto pequeño, con un menor número de atraques que los diferentes puertos deportivos en estudio, y destinado a una flota pesquera artesanal. Este hecho puede explicar en cierto modo las menores concentraciones de Irgarol 1051 halladas en sus aguas.

En la figura 9.8 se muestra la evolución temporal en los diferentes puertos, detallando además, las diferencias significativas entre los mismos.

En el puerto comercial de La Luz se observa que las concentraciones mínimas se alcanzan en los meses de verano, mientras que las máximas corresponden al invierno. El puerto deportivo del Real Club Náutico muestra un comportamiento similar, con valores significativamente inferiores en verano y máximos en los meses

## 9. Determinación de biocidas en muestras de agua de mar



**Figura 9.8 .-** Comparación de valores promedios de Irgarol 1051 por estación en cada puerto (*a* es significativamente mayor que *b* y *b* mayor que *c*). Las columnas representan los valores medios, mientras que las barras de error los errores estándares ( $\frac{s}{\sqrt{n}}$ , donde *s*=desviación estándar y *n*=número de determinaciones).

de invierno y otoño. Como afirman algunos autores, los trabajos de reparación que se llevan a cabo en los astilleros emiten una cantidad importante de biocidas al

medio circundante, dando lugar a niveles elevados de dichos compuestos en los meses más fríos, donde se centra gran parte de su actividad [165].

En el puerto de Mogán y el Puerto Base de Puerto Rico se caracterizan por mostrar niveles significativamente superiores ( $>60$  ng/L) en los meses de verano, donde aumenta la actividad deportiva ligada al turismo, estando esta observación en concordancia con lo descrito por otros autores [35, 56, 58, 59, 93, 163], aunque el clima suave con el que cuenta el archipiélago hace posible que los puertos deportivos puedan mantener una alta actividad durante todo el año, pudiendo esta tendencia ser una posible explicación a la evolución observada en el Puerto Escala de Puerto Rico y en el Muelle Deportivo en Las Palmas de Gran Canaria, donde se presentan, excepto para los meses de invierno, niveles estables de Irgarol 1051.

En cuanto al puerto pesquero de Arguineguín, se pueden observar leves variaciones entre las diferentes estaciones del año, con niveles significativamente inferiores en los meses de verano (nivel promedio de 7.4 ng/L) respecto a los meses de otoño e invierno (niveles promedio 16.6 y 16.0 ng/L), aunque dichas diferencias distan de ser importantes.

En la figura 9.9 se muestra la relación entre Diurón e Irgarol 1051 para cada puerto y estación en las que se llevó a cabo el muestreo. Se puede observar que para el puerto de La Luz, el Muelle Deportivo, el puerto deportivo del Real Club Náutico y el puerto pesquero Arguineguín, dicha relación varía entre uno y siete, siendo este hecho un indicativo de una mayor incidencia de Diurón en sus aguas y estando estos resultados en concordancia con las relaciones documentadas por otros autores [48, 58–60, 92]. Por el contrario, en los puertos deportivos situados en el área turística de la isla (el puerto de Mogán y en ambas dársenas del puerto deportivo de Puerto Rico), dicha relación se mantuvo con valores inferiores a uno

## 9. Determinación de biocidas en muestras de agua de mar

durante gran parte del periodo de muestreo, poniéndose de manifiesto que en dichos puertos existe una mayor incidencia de Irgarol 1051 que de Diurón. Esta diferencia puede ser un indicio del empleo de diferentes formulaciones.

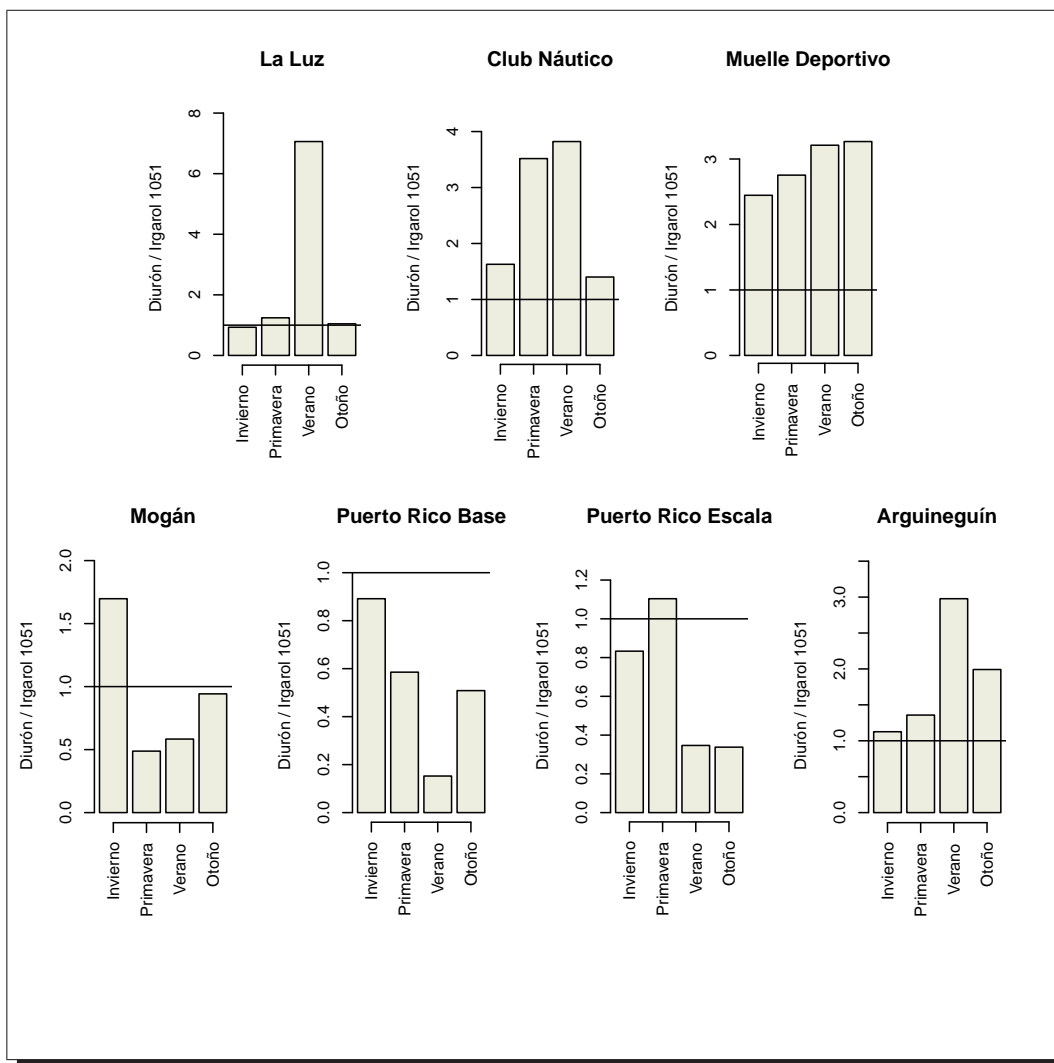


Figura 9.9 .- Relación (Diurón)/(Irgarol 1051) por puerto y mes.

### 9.3. Evaluación probabilística del riesgo ecológico

Varios estudios llevados a cabo sobre organismos autótrofos, han revelado la elevada toxicidad que muestra el Irgarol 1051 sobre especies no objetivo. Por ejemplo a concentraciones de tan solo 136 ng/L causa daños importantes sobre organismos fitoplanctónicos como la diatomea *Navicula pelliculosa* [41]. Su efecto se hace notar a concentraciones incluso inferiores, a 63 ng/L la actividad fotosintética del perifiton<sup>1</sup> se ve drásticamente afectada [44]. En cuanto a organismos más complejos y relevantes como las fanerógamas marinas, se ha observado que concentraciones de 180 ng/L disminuyen de forma considerable la actividad fotosintética de *Zostera marina* [45].

El Diurón muestra una toxicidad menos acusada pero nada despreciable. Concentraciones en el intervalo de 100 a 1000 ng/L disminuyen significativamente la actividad fotosintética de las fanerógamas marinas *Halophila ovalis* y *Zostera capricornis* [87], además, en conjunción con el Irgarol 1051, se han descrito efectos sinérgicos [86,166] y aditivos [167].

En Europa, nos encontramos con que determinadas administraciones han tomado medidas para mitigar los efectos de estos compuestos en el medio marino. En el Reino Unido se ha restringido el empleo de alguno de ellos, quedando el Diurón excluido de esta actividad y pudiéndose emplear el Irgarol 1051 sólo en embarcaciones de más de 25 m de eslora [33]. Por otro lado, en Holanda se ha establecido una concentración máxima permisible (MPC) de 430 ng/L para el Diurón [58] y propuesto un valor de MPC de 24 ng/L para Irgarol 1051 [46]. De

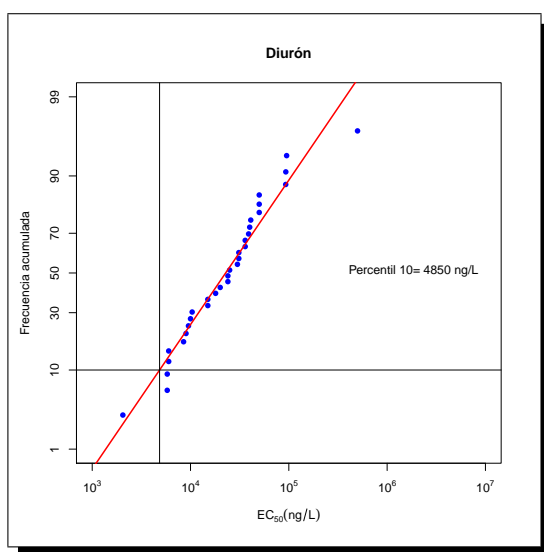
---

<sup>1</sup>Mezcla compleja de algas, cianobacterias y demás microorganismos que viven adheridos a las superficies sumergidas y que constituyen la principal fuente de alimento de algunos invertebrados y determinados peces.

## 9. Determinación de biocidas en muestras de agua de mar

los datos de concentración recolectados durante el periodo mayo 2008 - mayo 2009, ninguna de las muestras superó el valor de MPC establecido para el Diurón, pero el 34.6 % si lo hizo en el caso del Irgarol 1051.

Con el fin de evaluar de una forma más profunda el riesgo ecológico que representan estos compuestos para los grupos taxonómicos más sensibles, se empleó una aproximación probabilística. Este tipo de evaluación ha sido utilizada con anterioridad por diversos autores [41, 59, 114, 115, 117, 118, 120, 121], representando una medida más realista que el empleo del cociente de riesgo [111]. El uso de esta aproximación tiene como principal objetivo la sustentabilidad de las poblaciones, comunidades y ecosistemas, más que de organismos individuales (siempre que no se trate de especies en peligro de extinción o de interés comercial) [41].



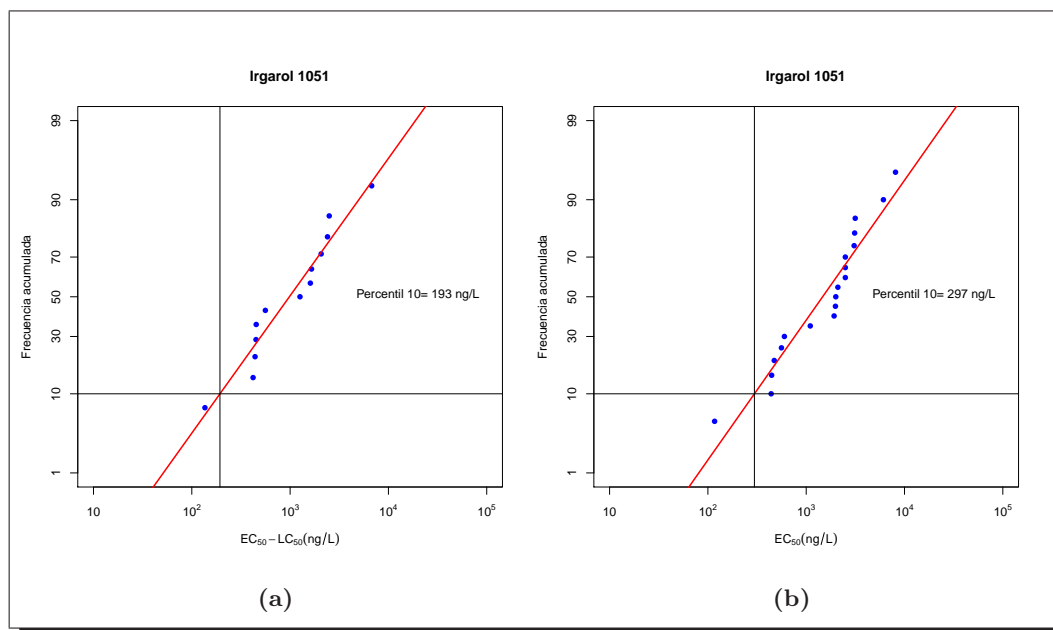
**Figura 9.10** .- Distribución de los datos de toxicidad de Diurón, datos recopilados por Landa y colaboradores [59].

El conjunto de datos de toxicidad para el Diurón e Irgarol 1051 fueron extraídos de referencias recientes donde se emplea esta aproximación [59, 121]. En el caso del Irgarol 1051 se seleccionaron dos conjuntos de datos de toxicidad con el fin de comparar los resultados obtenidos. En la tabla 7.1



### 9.3. Evaluación probabilística del riesgo ecológico

se muestran dichos datos y en las figuras 9.10 y 9.11 el cálculo del percentil 10 para las diferentes listas empleadas. El establecimiento de un umbral igual al percentil 10 de los datos de toxicidad suele ser considerada como una medida conservadora, además teniendo en cuenta que los efectos tóxicos del Irgarol 1051 son reversibles [120].



**Figura 9.11** .- Distribución de los datos de toxicidad de Irgarol 1051, (a) datos recopilados por Hall y colaboradores [121], (b) datos recopilados por Landa y colaboradores [59].

Para el Irgarol 1051 se obtuvo un valor del percentil 10 de 193 ng/L para los datos recopilados por Hall y colaboradores [121] y de 297 ng/L para los datos recopilados por Landa y colaboradores [59]. En otros estudios, mediante el empleo de diferentes conjuntos de datos de toxicidad para el Irgarol 1051, se han calculado valores del percentil 10 de 136 ng/L [41] y de 251 ng/L [120].

## 9. Determinación de biocidas en muestras de agua de mar

---

Respecto al Diurón, el percentil 10 corresponde a una concentración de 4850 ng/L, con lo que se confirma que, de acuerdo con los datos de toxicidad expuestos en la tabla 7.1 (parte experimental), las especies autótrofas evaluadas se muestran más sensibles al Irgarol 1051.

En la tabla 9.2 se muestran diversos parámetros acerca del ajuste de los datos de toxicidad, además de los valores de los percentiles 5 y 10. Se observa una distribución normal en todos los casos junto a un buen ajuste lineal de los datos ( $R^2 > 0.9$ ).

**Tabla 9.2** .- Ajuste del conjunto de datos de toxicidad.

<i>Datos</i>	<i>N<sup>a</sup></i>	<i>Percentil</i> <i>5 (ng/L)</i>	<i>Percentil</i> <i>10 (ng/L)</i>	<i>R<sup>2b</sup></i>	<i>p-valor<sup>c</sup></i>
<i>Irgarol 1051 [121]</i>	13	122	193	0.9399	0.5773
<i>Irgarol 1051 [59]</i>	19	189	297	0.9188	0.1499
<i>Diurón [59]</i>	32	3 130	4 850	0.9516	0.4387

<sup>a</sup>Número de datos de toxicidad empleados.

<sup>b</sup>Coefficiente de regresión.

<sup>c</sup>Resultado del test de normalidad de Shapiro-Wilk, los datos están normalmente distribuidos cuando el p-valor  $\geq 0.05$ .

De la misma forma, se aplicaron los análisis pertinentes a los datos de exposición, mostrándose los resultados de los ajustes en la tabla 9.3. En ella se puede observar los parámetros que confirman la bondad del ajuste (coeficientes de regresión  $> 0.9$  y p-valores  $\geq 0.05$ ) junto con los valores máximos y mínimos hallados en las muestras y el percentil 90 para cada conjunto de datos.

Posteriormente, se calculó la probabilidad de excedencia para los percentiles

### 9.3. Evaluación probabilística del riesgo ecológico

5 y 10 y el área bajo las curvas de probabilidad conjunta (*Joint Probability Curves*, JPC) (tabla 9.4). El empleo de este tipo de curvas no resulta de mucha utilidad en la predicción cuantitativa, pero aportan información cualitativa de gran interés [111]. Recientemente otros autores, al igual que nosotros, han empleado el área bajo la curva de probabilidad conjunta para, en la medida de lo posible, caracterizar cuantitativamente el riesgo de todo el conjunto de datos [168].

Tabla 9.3 .- Ajuste del conjunto de datos de exposición.

<i>Datos</i>	<i>N<sup>a</sup></i>	<i>min-max (ng/L)</i>	<i>Percentil 90<sup>b</sup></i>	<i>R<sup>2</sup> <sup>c</sup></i>	<i>p-valor<sup>d</sup></i>
<i>Diurón</i>					
<i>Todos</i>	181	2.3-203.7	77.8	0.9961	0.6596
<i>Puertos</i>					
<i>La Luz</i>	35	3.6-55.2	40.4	0.9774	0.6305
<i>Club Náutico</i>	28	14.7-155.2	90.1	0.9288	0.1196
<i>Muelle Deportivo</i>	35	20.0-195.0	125.9	0.9695	0.5081
<i>Mogán</i>	28	4.5-93.1	49.6	0.9844	0.9067
<i>Puerto Rico Base</i>	21	2.3-37.1	34.8	0.9771	0.7269
<i>Puerto Rico Escala</i>	21	2.4-203.7	74.3	0.9650	0.5975
<i>Arguineguín</i>	13	8.1-59.4	42.7	0.9693	0.9382
<i>Meses</i>					
<i>Mayo 2008</i>	25	3.6-113.0	77.6	0.9704	0.2572

<sup>a</sup>Número de datos.

<sup>b</sup>Percentil 90 según ajuste.

<sup>c</sup>Coefficiente de regresión.

<sup>d</sup>Test de Shapiro-Wilk. Datos normalmente distribuidos cuando  $p\text{-valor} \geq 0.05$ .

## 9. Determinación de biocidas en muestras de agua de mar

Continuación					
<i>Datos</i>	<i>N<sup>a</sup></i>	<i>min-max (ng/L)</i>	<i>Percentil 90<sup>b</sup></i>	<i>R<sup>2</sup> <sup>c</sup></i>	<i>p-valor<sup>d</sup></i>
<i>Julio 2008</i>	26	2.3-111.2	88.0	0.9556	0.5383
<i>Septiembre 2008</i>	26	8.4-195.0	116.1	0.9651	0.2233
<i>Noviembre 2008</i>	26	2.4-80.8	68.6	0.9314	0.1175
<i>Enero 2009</i>	26	2.6-104.2	80.8	0.9115	0.0659
<i>Marzo 2009</i>	26	4.8-203.7	112.6	0.9861	0.7370
<i>Mayo 2009</i>	26	3.7-95.4	76.0	0.9729	0.3470
<i>Irgarol 1051</i>					
<i>Todos</i>	182	2.4-146.5	52.7	0.9921	0.2658
<i>Puertos</i>					
<i>La Luz</i>	35	2.4-51.6	34.8	0.9641	0.0676
<i>Club Náutico</i>	28	4.4-72.1	51.6	0.9696	0.3739
<i>Muelle Deportivo</i>	35	7.3-50.7	39.9	0.9867	0.9080
<i>Mogán</i>	28	8.2-134.6	63.5	0.9759	0.7332
<i>Puerto Rico Base</i>	21	6.7-146.5	75.5	0.9577	0.6697
<i>Puerto Rico Escala</i>	21	3-145.9	100.7	0.9747	0.7796
<i>Arguineguín</i>	14	3.3-19.7	23.6	0.9338	0.2742
<i>Meses</i>					
<i>Mayo 2008</i>	26	2.4-145.9	80.5	0.9767	0.4778
<i>Julio 2008</i>	26	3.2-146.5	84.8	0.9691	0.2244

<sup>a</sup>Número de datos.

<sup>b</sup>Percentil 90 según ajuste.

<sup>c</sup>Coefficiente de regresión.

<sup>d</sup>Test de Shapiro-Wilk. Datos normalmente distribuidos cuando p-valor  $\geq 0.05$ .

### 9.3. Evaluación probabilística del riesgo ecológico

Continuación

<i>Datos</i>	<i>N<sup>a</sup></i>	<i>min-max (ng/L)</i>	<i>Percentil 90<sup>b</sup></i>	<i>R<sup>2</sup> <sup>c</sup></i>	<i>p-valor<sup>d</sup></i>
<i>Septiembre 2008</i>	26	3.8-89.3	64.2	0.9846	0.7910
<i>Noviembre 2008</i>	26	8.2-72.1	59.2	0.9632	0.1862
<i>Enero 2009</i>	26	6.7-44.7	39.8	0.9848	0.7094
<i>Marzo 2009</i>	26	3-50.8	36.5	0.9427	0.4120
<i>Mayo 2009</i>	26	3.3-49.2	40.9	0.9624	0.4414

<sup>a</sup>Número de datos.

<sup>b</sup>Percentil 90 según ajuste.

<sup>c</sup>Coefficiente de regresión.

<sup>d</sup>Test de Shapiro-Wilk. Datos normalmente distribuidos cuando  $p\text{-valor} \geq 0.05$ .

Un ejemplo del cálculo de la probabilidad de excedencia del percentil 10 para el Irgarol 1051 y una curva de probabilidad conjunta para este mismo biocida, se muestran en las figuras 9.12a y 9.12b respectivamente.

**Diurón.-** Los valores obtenidos para el percentil 90 (tabla 9.3) en los diferentes puertos son, exceptuando para el Muelle Deportivo (125.9 ng/L), siempre inferiores a 100 ng/L. El análisis realizado por meses muestra que septiembre de 2008 y marzo de 2009 se caracterizaron por presentar valores levemente superiores al resto. Para todos los datos recopilados el percentil 90 corresponde a una concentración de 77.8 ng/L. Estos niveles son muy inferiores a los percentiles 5 y 10 de toxicidad para especies vegetales (3130 ng/L y 4850 ng/L, respectivamente) por lo que la probabilidad de excedencia de los mismos resulta muy baja (inferior a 0.01 %) en todos los casos.

9. Determinación de biocidas en muestras de agua de mar

Tabla 9.4.- Probabilidades de excedencia y áreas relativas.

Datos	Diurón				Irgarol 1051						
	Landa y col. [59]				Landa y col. [59]			Hall y col. [121]			
	Exced. 5° (%)	Exced. 10 <sup>b</sup> (%)	Área <sup>c</sup> (%)		Exced. 5° (%)	Exced. 10 <sup>b</sup> (%)	Área <sup>c</sup> (%)	Exced. 5° (%)	Exced. 10 <sup>b</sup> (%)	Área <sup>c</sup> (%)	
Todos	>0.01	<0.01	<0.01		0.27	0.05	0.14	1.18	0.25	0.39	
	<i>Puertos</i>										
La Luz	<0.01	<0.01	<0.01		0.17	0.04	0.07	0.61	0.16	0.19	
Club Náutico	<0.01	<0.01	<0.01		0.21	0.03	0.13	1.00	0.20	0.37	
Muelle Deportivo	<0.01	<0.01	<0.01		<0.01	<0.01	0.04	0.02	<0.01	0.19	
Mogán	<0.01	<0.01	<0.01		0.30	0.04	0.20	1.54	0.27	0.56	
Puerto Rico Base	<0.01	<0.01	<0.01		0.89	0.18	0.32	3.22	0.83	0.79	
Puerto Rico Escala	<0.01	<0.01	<0.01		3.35	1.29	0.68	7.37	3.20	1.38	
Arguineguín	<0.01	<0.01	<0.01		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.04	
	<i>Meses</i>										
Mayo 2008	<0.01	<0.01	<0.01		2.54	1.05	0.52	5.39	2.44	1.04	
Julio 2008	<0.01	<0.01	<0.01		2.82	1.19	0.57	5.88	2.71	1.13	

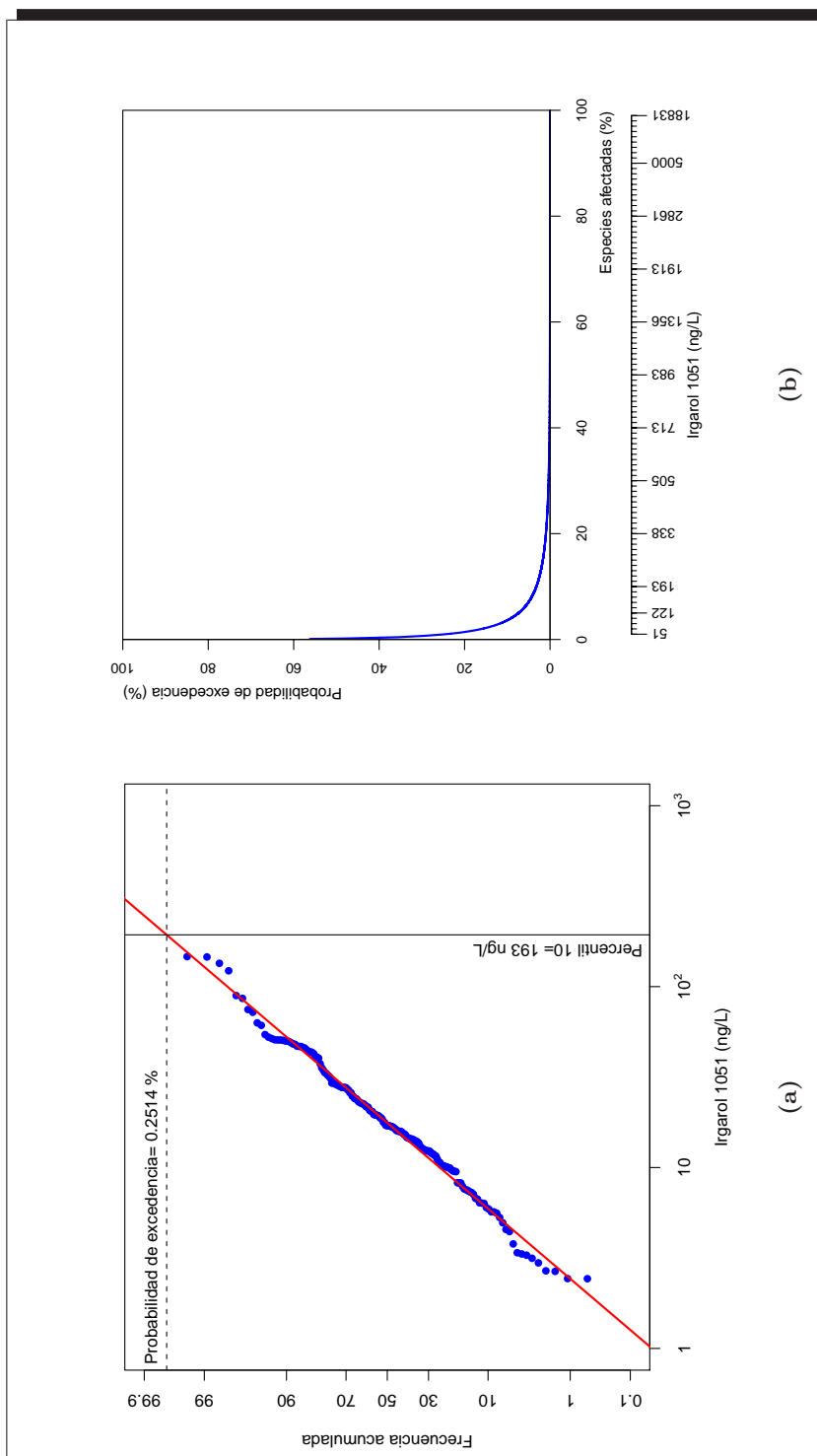
Continuación

Datos	Diurón				Irgarol 1051					
	Landa y col. [59]				Landa y col. [59]			Hall y col. [121]		
	Exced. 5 <sup>o</sup> (%)	Exced. 10 <sup>b</sup> (%)	Área <sup>c</sup> (%)		Exced. 5 <sup>o</sup> (%)	Exced. 10 <sup>b</sup> (%)	Área <sup>c</sup> (%)	Exced. 5 <sup>o</sup> (%)	Exced. 10 <sup>b</sup> (%)	Área <sup>c</sup> (%)
Septiembre 2008	<0.01	<0.01	<0.01		0.72	0.17	0.24	2.41	0.67	0.60
Noviembre 2008	<0.01	<0.01	<0.01		0.17	0.02	0.17	1.04	0.15	0.48
Enero 2009	<0.01	<0.01	<0.01		<0.01	<0.01	0.05	0.06	<0.01	0.18
Marzo 2009	<0.01	<0.01	<0.01		0.01	<0.01	0.04	0.12	0.01	0.15
Mayo 2009	<0.01	<0.01	<0.01		0.05	0.01	0.07	0.34	0.05	0.21

<sup>a</sup>Probabilidad de excedencia del percentil 5 de toxicidad.

<sup>b</sup>Probabilidad de excedencia del percentil 10 de toxicidad.

<sup>c</sup>Área bajo curva de probabilidad conjunta expresada como porcentaje. Un valor de área del 100 (%) correspondería a que la probabilidad de excedencia de los niveles de toxicidad para todo el conjunto de especies vulnerables (datos de toxicidad) es del 100%.



**Figura 9.12** .- Cálculo de la probabilidad de excedencia (a) y curva de probabilidad acumulada (b) para el Irgarol 1051. Datos de toxicidad recopilados por Hall y colaboradores [121]; conjunto de datos de exposición:(a).- todos los puertos en estudio, (b).- Puerto Escala (Puerto Rico).



### 9.3. Evaluación probabilística del riesgo ecológico

---

El área bajo las curvas de probabilidad conjunta es inferior al 0.01 % del total. Este hecho se debe a que las mismas se caracterizan por un perfil muy próximo a los ejes, siendo el riesgo asumido por la presencia de Diurón en las aguas, durante el periodo muestreado, aceptable en todos los casos [112] (figura 7.2).

Tan sólo se ha realizado otro estudio donde se evalúa el riesgo ecológico para el Diurón mediante la aproximación probabilística en puertos, del cuál se ha extraído los datos de toxicidad para las diferentes especies autótrofas [59]. En dicho estudio se llegaron a medir concentraciones de Diurón de hasta 1380 ng/L, por lo que las probabilidades de excedencia del percentil 10 fueron superiores a las aquí determinadas (hasta 5.49 %).

**Irgarol 1051.-** En cuanto al Irgarol 1051, al mostrar una toxicidad más elevada para organismos vegetales que el Diurón, los niveles detectados en este estudio tienen una mayor repercusión. Ambas dársenas del puerto deportivo de Puerto Rico y el puerto de Mogán presentan valores del percentil 90 superior a 50 ng/L, mientras que el valor más bajo corresponde al puerto pesquero de Arguineguín (23.6 ng/L).

En cuanto a los valores obtenidos por meses, muestran que el periodo correspondiente a mayo de 2008-noviembre de 2008 se caracteriza por valores del percentil 90 superiores a 50 ng/L.

La probabilidades de excedencia de los percentiles 5 y 10 obtenidas mediante el empleo del conjunto de datos de toxicidad recopilados por Landa y colaboradores [59] se caracterizan por valores bajos (<3.5 %). La dársena Puerto Escala de Puerto Rico presenta los mayores porcentajes con una probabilidad de excedencia del percentil 10 igual a 1.29 %, dando a entender que el riesgo que acarrearán los niveles de Irgarol 1051 medidos no son preocupantes.

## 9. Determinación de biocidas en muestras de agua de mar

---

Mediante el empleo de la otra lista de toxicidad, recopilada por Hall y colaboradores [121], se observan los mismos comportamientos pero, como cabe esperar, con probabilidades de excedencia levemente superiores. La dársena Puerto Escala de Puerto Rico vuelve a mostrar los máximos valores con una probabilidad de excedencia del percentil 10 igual a 3.20 %, mientras que el puerto pesquero de Arguineguín se caracteriza por las probabilidades más bajas (<0.01 %).

En comparación con los resultados obtenidos en otros estudios, los valores de probabilidad de excedencia aquí determinados son inferiores, siendo este hecho reflejo de las menores concentraciones de Irgarol 1051 halladas. Por ejemplo, en el Golfo de Nápoles se han llegado a determinar probabilidades de excedencia del percentil 10 de hasta 9.20 % [59], en California de hasta 7.33 % [121], en Florida de hasta 3.6 % [120] y en diversos puertos deportivos de Europa durante la década de los 90 de hasta 24 % [41].

El análisis llevado a cabo por meses reveló que las mayores probabilidades de excedencia se dieron en los meses de mayo y julio de 2008, pero en ningún caso resultaron superiores al 2 % para el percentil 10 de los datos de toxicidad recopilados por Landa y colaboradores [59] y al 3 % para los datos recopilados por Hall y colaboradores [121].

El área bajo las curvas de probabilidad conjunta se caracterizó por bajos valores en todos los casos (<2 %), revelando un perfil próximo a los ejes y por lo tanto un riesgo aceptable según las directrices aportadas por la Agencia de Protección Medioambiental Norteamericana (EPA) [112] (figura 7.2).

Hay que tener en cuenta que todos los pronósticos científicos acarrearán una incertidumbre; en el caso de la evaluación probabilística del riesgo ecológico, esta incertidumbre se asocia a la caracterización de los datos de exposición, de los datos

### **9.3. Evaluación probabilística del riesgo ecológico**

---

de toxicidad y a su propio cálculo [41]. En el análisis llevado a cabo en el presente estudio sólo se ha evaluado el riesgo debido a la presencia individual de Diurón e Irgarol 1051, sin tener en cuenta los posibles efectos de su conjunción con otros contaminantes presentes en el medioambiente portuario (hidrocarburos, metales, grandes concentraciones de nutrientes, etc.).

# *SEDIMENTOS*

---

# Capítulo 10

## *Optimización de la extracción de biocidas en sedimentos mediante MAE-SPE*

Para la extracción de los biocidas antiincrustantes seleccionados (Diurón, TCMTB, Irgarol 1051 y Diclofluanid) a partir de muestras de sedimentos procedentes de los diferentes puertos en estudio, se optó por la extracción asistida por microondas (MAE) y un posterior paso de limpieza y preconcentración del extracto mediante la extracción en fase sólida (SPE). Como se comentó en la Introducción, la extracción asistida por microondas aporta una serie de ventajas que la hacen idónea para el análisis rutinario (capacidad para realizar extracciones simultáneas, poco consumo de tiempo y disolvente, etc.). En la preconcentración y limpieza del extracto procedente de la extracción asistida por microondas, se empleó la metodología previamente optimizada para muestras de agua de mar mediante SPE (capítulo 8).

Para la optimización de los parámetros inherentes a la extracción asistida por microondas se emplearon diseños factoriales con el objetivo de determinar

las interacciones existentes entre variables y disminuir el número de ensayos necesarios [169–173].

La técnica de determinación seleccionada para llevar a cabo toda la optimización de la extracción, fue la cromatografía líquida acoplada a la detección por absorbancia ultravioleta-visible (HPLC-DAD), mientras que para el cálculo de los parámetros analíticos y la cuantificación en muestras reales se empleó el sistema cromatográfico LC-MS/MS.

### 10.1. Ensayos preliminares

Antes de comenzar con la optimización de las condiciones propias de MAE, se realizaron diversos ensayos preliminares con el fin de acoplar un paso posterior de limpieza y preconcentración del extracto mediante SPE, siendo los objetivos principales:

- ① Seleccionar la composición de disolvente a emplear en la extracción asistida por microondas.
- ② Determinar el efecto de diferentes proporciones de disolvente orgánico/agua sobre la recuperación de los analitos mediante la extracción en fase sólida.

#### Elección del disolvente de extracción

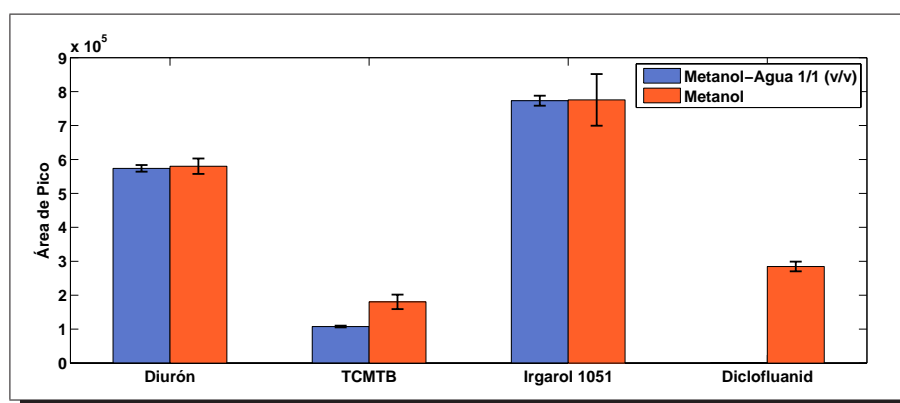
Con el fin de evitar competencias con la fase sólida, nos decantamos por emplear un disolvente polar como el metanol, y por lo tanto con una elevada constante dieléctrica ( $\epsilon' = 32.6$ ), además este disolvente también se caracteriza por un alto factor de disipación ( $\tan\delta = 0.64$ ) [142], por lo que las condiciones de potencia y tiempo a aplicar deben ser bajas, si se pretende realizar la extracción

## 10. Optimización de la extracción de biocidas en sedimentos mediante MAE-SPE

---

a una temperatura constante cercana al punto de ebullición del disolvente.

Para valorar la influencia de la mezcla de metanol y agua en la extracción de los diferentes compuestos, se realizó un ensayo previo donde se fijaron las condiciones de la extracción asistida por microondas (potencia 200 W, tiempo 10 min y volumen 10 mL). En la figura 10.1 se muestran las áreas obtenidas de los diferentes biocidas en estudio, a partir de la extracción de muestras de sedimento enriquecidas con 10  $\mu\text{g/g}$ . El peso empleado por muestra fue de 1 g. En esta ocasión no se empleó ningún procedimiento posterior de limpieza y/o preconcentración.



**Figura 10.1** .- Efecto de la composición del disolvente en la extracción asistida por microondas (media de dos determinaciones, la barras de error representan la desviación estándar).

Se observa que para el caso del Diurón e Irgarol 1051 las áreas obtenidas son similares, tanto si se emplea como disolvente una proporción de metanol/agua 1/1 (v/v) o sólo metanol. No ocurre lo mismo ni para el TCMTB ni para el Diclofluanid, ya que presentan áreas sustancialmente inferiores para la combinación de metanol y agua. Este hecho puede deberse a la menor solubilidad

en agua de estos dos biocidas respecto de los anteriores (tabla 1.7). Teniendo en cuenta este factor, optamos por seleccionar el metanol como el disolvente de extracción más adecuado para nuestros propósitos.

### Dilución del extracto

Para la preconcentración y limpieza del extracto procedente de MAE se escogió el proceso de extracción por SPE optimizado previamente para muestras de agua de mar (capítulo 8), aunque es necesario conocer la influencia que tienen las diferentes proporciones del extracto en agua sobre la retención de los analitos por la fase sólida. Para ello, primero se prepararon varias muestras enriquecidas con la misma cantidad de los biocidas en estudio ( $1 \mu\text{g}$  para cada uno) en diversos volúmenes de agua Milli-Q (25, 50, 100, 200 y 500 mL), a los que se les añadió 10 mL de metanol con el fin de obtener diferentes proporciones de la mezcla metanol/agua (v/v). También se prepararon muestras con 100 mL de agua Milli-Q sin metanol. A todas ellas se les aplicaron la extracción por SPE previamente optimizada. Los resultados expresados como área de pico se muestran en la figura 10.2.

Se observan áreas similares para las distintas proporciones de metanol/agua ( $1/2.5$ ,  $1/5$ ,  $1/10$ ,  $1/20$  y  $1/50$ ) y para la muestra de agua Milli-Q, lo que nos lleva a pensar que no se produce una competencia apreciable entre las diferentes proporciones de metanol evaluadas y la fase sólida empleada.

A continuación se llevó a cabo el mismo ensayo, pero realizando el proceso completo mediante MAE-SPE. Para tal fin se emplearon muestras enriquecidas de sedimento ( $10\mu\text{g/g}$ ) y se fijaron las condiciones de extracción por MAE (200 W, 10 mL de metanol, 10 min) para 1 g de muestra. Los extractos procedentes de la



## 10. Optimización de la extracción de biocidas en sedimentos mediante MAE-SPE

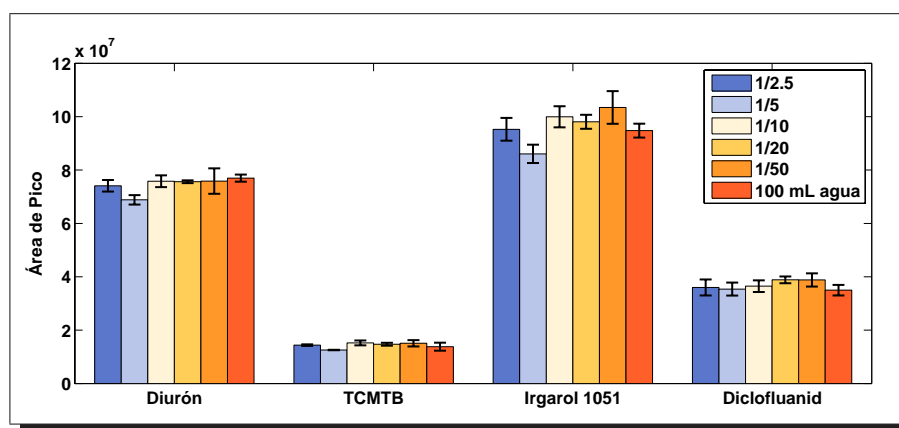


Figura 10.2.- Influencia de la proporción de agua sobre la retención de los analitos mediante SPE (media de dos determinaciones, la barras de error representan la desviación estándar).

extracción asistida por microondas se diluyeron en diferentes volúmenes de agua Milli-Q y se les aplicó la metodología optimizada mediante SPE. Los resultados expresados como áreas de pico se muestran en la figura 10.3.

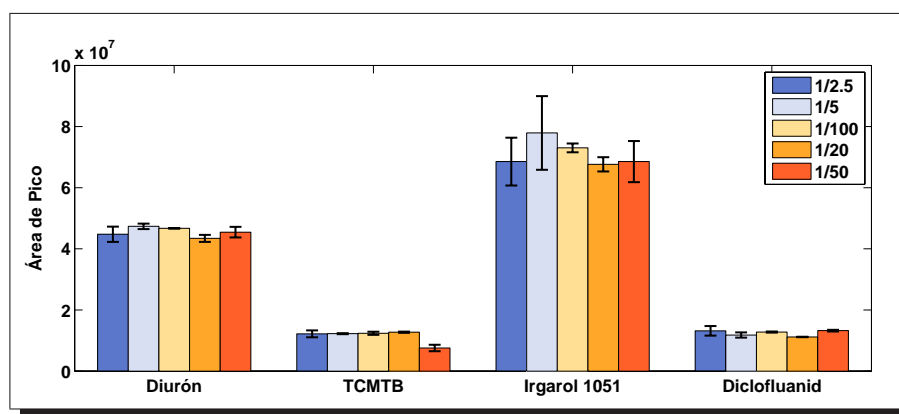


Figura 10.3.- Influencia de la la proporción de agua sobre la retención de los analitos mediante MAE-SPE (media de dos determinaciones, la barras de error representan la desviación estándar).

## 10.2. Optimización de variables en la extracción MAE

Se observa que las diferentes proporciones de metanol/agua empleadas para diluir el extracto y facilitar la retención por parte de la fase sólida, presentan áreas similares para todos los compuestos, al igual que en el ensayo anterior. Teniendo en cuenta este hecho, nos decantamos por seleccionar una proporción intermedia (1/10 metanol/agua, v/v) para nuestros objetivos. Estas condiciones se emplearon en todos los ensayos realizados posteriormente.

## 10.2. Optimización de variables en la extracción MAE

### Factores principales

Tabla 10.1 .- Diseño factorial  $2^3$ .

	<i>Volumen</i> ( <i>mL</i> )	<i>Potencia</i> ( <i>W</i> )	<i>Tiempo</i> ( <i>min</i> )
1	14	100	10
2	10	100	10
3	14	300	10
4	14	300	5
5	14	100	5
6	10	100	5
7	10	300	5
8	10	300	10

La primera etapa de la optimización consistió en un diseño factorial  $2^3$ , siendo 3 las variables en estudio (potencia, volumen de disolvente y tiempo de extracción) y 2 los niveles evaluados. Este diseño nos permite obtener información a cerca de la influencia que tiene cada variable sobre la recuperación de los compuestos y de las posibles interacciones

existentes entre las mismas. Los análisis se realizaron por duplicado y de manera aleatoria para evitar la influencia de variables ocultas. En la tabla 10.1 se muestra

## 10. Optimización de la extracción de biocidas en sedimentos mediante MAE-SPE

---

dicho diseño.

La evaluación del efecto de las estas variables y sus interacciones en la recuperación de cada analito se realizó mediante correlaciones parciales y bivariadas. En la tabla 10.2 se muestran sus valores. Las correlaciones varían entre -1 y 1, siendo -1 y 1 las correlaciones máximas, negativa y positiva respectivamente, y 0 la correlación mínima.

**Tabla 10.2** .- Correlaciones parciales y bivariadas entre variables independientes y dependiente.

	<i>Diurón</i>	<i>TCMTB</i>	<i>Irgarol 1051</i>	<i>Diclofluanid</i>
<i>Volumen</i>	0.243	0.023	0.244	0.397
<i>Potencia</i>	0.343	0.088	0.276	0.033
<i>Tiempo</i>	-0.480	-0.659	0.203	0.311
<i>Volumen</i> × <i>Potencia</i>	-0.091	-0.002	-0.072	-0.014
<i>Volumen</i> × <i>Tiempo</i>	0.137	0.020	-0.052	-0.142
<i>Tiempo</i> × <i>Potencia</i>	0.199	0.078	0.899	0.982

Se observa que las mayores correlaciones positivas para las recuperaciones del Irgarol 1051 y Diclofluanid se obtienen para la interacción existente entre la potencia y el tiempo de extracción, mientras que en el caso del Diurón ambas variables afectan, pero individualmente. Tanto en el caso del Diurón como del TCMTB se obtienen altas correlaciones con el tiempo de extracción, incidiendo éste de forma negativa sobre las recuperaciones de los mismos. Es lógico que estas variables sean las que provoquen una mayor variabilidad en las recuperaciones de los distintos compuestos, ya que las mismas se encargan en gran medida de

## 10.2. Optimización de variables en la extracción MAE

controlar la temperatura que se alcanza dentro de cada recipiente de extracción.

El volumen de extractante mostró una menor influencia sobre las recuperaciones de los diferentes analitos, por lo que se fijó un valor de 10 mL como suficiente para impregnar la muestra de forma homogénea.

Para la determinación de las condiciones óptimas de potencia y tiempo se llevó a cabo otro diseño experimental.

### Potencia y tiempo de extracción

Tabla 10.3 .- Diseño factorial  $3^2$ .

	<i>Bloque</i>	<i>Potencia</i> (W)	<i>Tiempo</i> (min)
1	1	200	7.5
2	1	300	10
3	1	100	5
4	1	200	7.5
5	2	100	10
6	2	200	5
7	2	200	7.5
8	2	300	7.5
9	3	100	7.5
10	3	200	7.5
11	3	200	10
12	3	300	5

Para conocer los valores óptimos de potencia y tiempo de extracción se realizó un diseño factorial  $3^2$  (2 variables en estudio y 3 niveles a evaluar), con una medida del punto central para cada uno de los tres bloques en los que se dividió el diseño. En la tabla 10.3 se muestra el mismo. Los ensayos se llevaron a cabo por duplicado.

Una vez realizadas las extracciones, los resultados se evaluaron mediante el análisis de la varianza (ANOVA) a un nivel de confianza del 95%.

## 10. Optimización de la extracción de biocidas en sedimentos mediante MAE-SPE

---

Mediante el ajuste polinomial de los mismos, se pudieron construir las superficies de respuesta que se muestran en la figura 10.4. Los coeficientes ( $R^2$ ) obtenidos para dichos modelos fueron iguales a 0.78, 0.85, 0.42 y 0.65 para el Diurón, TCMTB, Irgarol 1051 y Diclofluanid respectivamente. Se observa que las menores recuperaciones para todos los analitos se obtienen a tiempos y potencias bajas (5 min y 100 W), mientras que a valores intermedios se alcanzan las mayores recuperaciones para el TCMTB y Diclofluanid, resultando significativo ( $p < 0.05$ ) el término negativo que acompaña a dichas variables en el modelo ajustado para el TCMTB. Teniendo en cuenta este hecho se escogieron unas condiciones iguales a 200 W y 6 min para la extracción de todos los compuestos.

Una vez concluidos estos ensayos se dispuso de la metodología de extracción optimizada, que consistió en la aplicación de una potencia de 200W durante 6 min a una muestra de 1 g de sedimento, empleando 10 mL de metanol como extractante, para posteriormente filtrar el extracto con un filtro de jeringa de  $0.45 \mu\text{m}$  de tamaño de poro, combinarlo con 100 mL de agua Milli-Q y acabar aplicando el proceso de extracción en fase sólida previamente optimizado para muestras acuosas.

### 10.3. Parámetros analíticos

#### Análisis cromatográfico

Para el análisis cromatográfico se empleó la determinación optimizada mediante LC-MS/MS que se detalló en el apartado 8.3 del capítulo 8 (tabla 8.3). En la cuantificación de muestras reales se empleó como patrón interno Diurón- $d_6$ , empleándose la transición  $239 \Rightarrow 79$  para su medida.

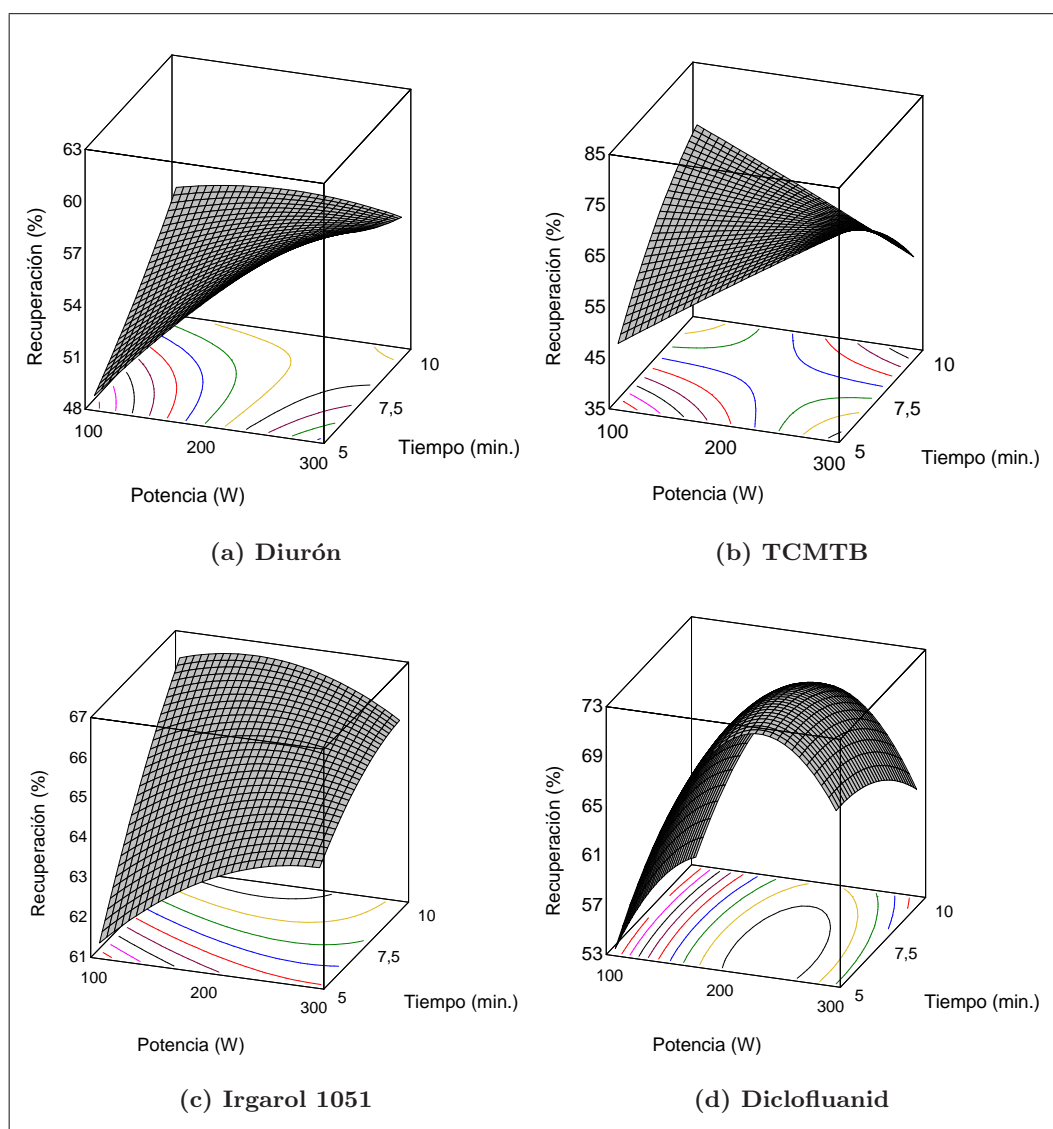


Figura 10.4 .- Superficies de respuesta potencia-tiempo para los biocidas en estudio.

En la figura 10.5, se muestra un cromatograma TIC (*Total Ion Current*) obtenido mediante la extracción por MAE-SPE de una muestra de sedimento enriquecida con la mezcla de los biocidas en estudio (10 ng/g) junto al patrón interno (Diurón-d<sub>6</sub>). Se observa una línea base limpia sin las numerosas

## 10. Optimización de la extracción de biocidas en sedimentos mediante MAE-SPE

---

interferencias que fueron visibles mediante la determinación por HPLC-DAD, mejorándose mediante el empleo de la determinación por LC-MS/MS la cuantificación de los analitos.

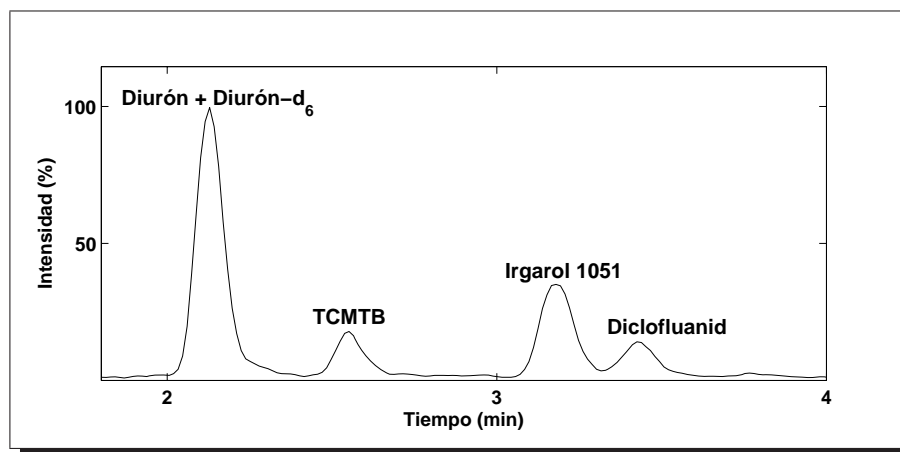


Figura 10.5 .- Cromatograma TIC obtenido a partir de la extracción mediante MAE-SPE de una muestra de sedimento enriquecida con la mezcla de los biocidas en estudio (10 ng/g) junto al patrón interno (Diurón-d<sub>6</sub>).

### Parámetros analíticos obtenidos mediante MAE-SPE-LC-MS/MS

Una vez se llevó a cabo toda la optimización, se evaluó la metodología mediante la determinación de los parámetros analíticos a dos niveles diferentes de concentración (10 y 100 ng/g). Además se calcularon los límites de detección y cuantificación basándonos en una relación señal/ruido de 3 y 10 respectivamente. En la tabla 10.4 se muestran los valores de los diversos parámetros.

Las recuperaciones obtenidas, a los dos niveles evaluados, se caracterizan por valores superiores al 75 % para todos los analitos, mientras que las desviaciones estándares relativas (RSD) no superaron en ningún caso el 7 %. Los límites de

### 10.3. Parámetros analíticos

**Tabla 10.4 .-** Parámetros analíticos obtenidos mediante MAE-SPE-LC-MS/MS.

<i>Compuesto</i>	<i>10 ng/g</i>		<i>100 ng/g</i>		<i>L.O.D.<sup>c</sup></i>	<i>L.O.Q.<sup>d</sup></i>
	<i>Recup.<sup>a</sup></i>	<i>R.S.D.<sup>b</sup></i>	<i>Recup.<sup>a</sup></i>	<i>R.S.D.<sup>b</sup></i>		
	(%)	(%)	(%)	(%)		
<i>Diurón</i>	99.7	5.4	92.9	5.1	0.2	0.7
<i>TCMTB</i>	79.3	3.3	78.1	3.3	0.3	1.0
<i>Irgarol 1051</i>	84.3	4.9	91.1	2.5	0.1	0.4
<i>Diclofluanid</i>	76.1	6.5	76.2	4.4	0.3	1.0

<sup>a</sup>Recuperación (n=6).

<sup>b</sup>Desviación estándar relativa (n=6).

<sup>c</sup>Límite de detección. (S/N=3).

<sup>d</sup>Límite de cuantificación. (S/N=10).

detección oscilaron entre 0.1 y 0.3 ng/g, y los de cuantificación entre 0.4 y 1.0 ng/g, siendo estos valores adecuados para la determinación de los biocidas en estudio si tenemos en cuenta los niveles previamente determinados por otros autores en la costa española [79, 80].

Para la construcción de las curvas de calibrado se emplearon seis concentraciones diferentes comprendidas entre 2.5 y 500 ng/g siendo el coeficiente de regresión ( $R^2$ ) de las mismas superior a 0.995.



# Capítulo 11

## *Determinación de biocidas en muestras de sedimentos*

La determinación de los diferentes biocidas en sedimentos se llevó a cabo de forma bimestral, durante el periodo comprendido entre enero de 2008 y mayo de 2009, sobre muestras recolectadas en los puntos seleccionados (figura 5.1). Un total de 61 muestras fueron analizadas mediante la metodología optimizada. En la tabla A.3 del anexo A se muestran los resultados hallados. Las muestras correspondientes a los puntos B6 de noviembre de 2008 y D3 de marzo de 2009 no pudieron ser recolectadas debido a diversos problemas técnicos.

Los criterios empleados para la confirmación de la presencia de los diferentes compuestos en las muestras de sedimentos fueron los mismos que los utilizados para las muestras de agua de mar, ésto es, el empleo del tiempo de retención, dos iones productos y la relación de abundancia entre los mismos con un porcentaje de incertidumbre marcado por la Directiva 2002/657 [160].

Antes de llevar a cabo la extracción, se añadió a cada muestra un volumen conocido de patrón interno. En la cuantificación se emplearon curvas de calibrado

construidas en el intervalo de concentraciones de 2.5 a 500 ng/g.

De los cuatro compuestos en estudio, fue posible determinar la presencia de Diurón, Irgarol 1051 y Diclofluamid en las muestras recolectadas. En la figura 11.1, se presentan los iones de cuantificación correspondientes a estos tres compuestos determinados a partir de una muestra real mediante LC-MS/MS.

El otro biocida monitorizado (TCMTB) se caracterizó por presentar siempre niveles inferiores al límite de detección de la metodología empleada. Bajo nuestro conocimiento, este es uno de los primeros estudios que se dedica a determinar la presencia de dicho biocida en sedimentos procedentes de áreas portuarias. Por otro lado, hasta la fecha, los estudios llevados a cabo en agua de mar han revelado una total ausencia del mismo en la fase disuelta [48, 52, 70, 84, 93, 105, 106].

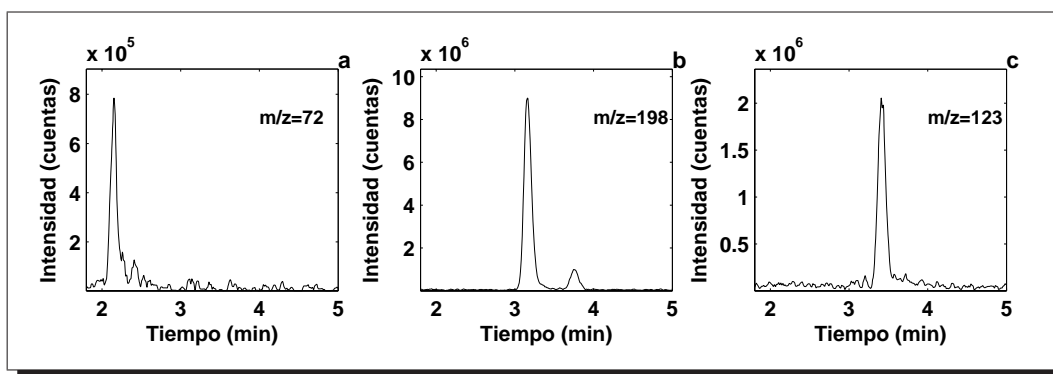


Figura 11.1.- Cromatograma de diversos iones monitorizados en MRM correspondiente a la muestra D3 de Mayo de 2009, (a): Diurón, (b) Irgarol 1051 y (c) Diclofluamid.

En la figura 11.2 se muestran los diferentes niveles de los biocidas objeto estudio por estación de muestreo y mes.

**Diurón.-** El Diurón se caracteriza por ser relativamente soluble en agua (tabla 1.7), siendo su  $\log K_{ow}$  igual a 2.85 y afirmando algunos autores por este

## 11. Determinación de biocidas en muestras de sedimentos

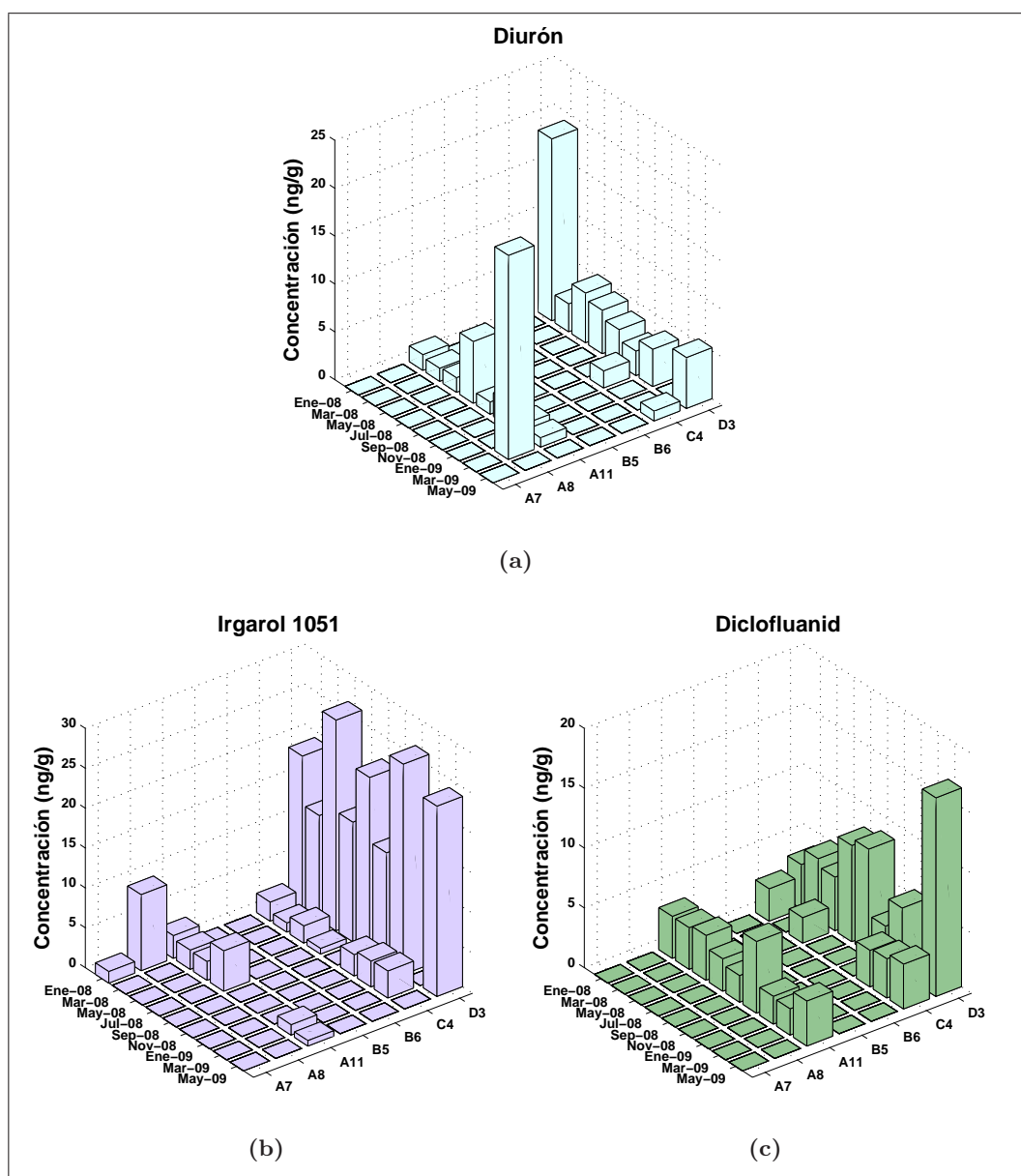


Figura 11.2.- Niveles de los diferentes biocidas determinados en muestras de sedimentos.

motivo, que dicho biocida va a encontrarse fundamentalmente en fase disuelta, presentando una débil adsorción sobre el sedimento [37]. De hecho, el Diurón

---

presenta una menor adsorción sobre el material particulado cuando se compara con el Irgarol 1051 y el Diclofluanid [94], siendo esta causa una posible explicación a que las concentraciones de Diurón determinadas en las muestras de sedimentos, en muchas ocasiones, sean inferiores a las de Irgarol 1051 y Diclofluanid.

Las concentraciones de Diurón halladas oscilaron entre niveles inferiores al límite de detección de la metodología empleada y 21.3 ng/g (muestra A8, marzo 2008). Estos niveles son muy inferiores a los detectados por otros autores, por ejemplo, en el Reino Unido se han documentado concentraciones de hasta 1 680 ng/g [75], 1 420 ng/g [95] y 395 ng/g [53], en Japón de hasta 1 350 ng/g [60] y en España (costa catalana) de hasta 137 ng/g [79]. Sin embargo, otros estudios han referenciado niveles similares a los aquí mencionados, en Tailandia, por ejemplo, se han determinado concentraciones de Diurón en sedimentos de hasta 25 ng/g [96] y en Vietnam de hasta 3 ng/g [82].

Las altas concentraciones encontradas por otros autores en sedimentos se han relacionado con la presencia de partículas de pintura en los mismos [75, 95]. La presencia de estas partículas hace que aumente la persistencia de los diferentes biocidas, por ejemplo, para la degradación anaeróbica del Diurón en sedimentos se ha calculado una vida media ( $t_{1/2}$ ) de 14 días, mientras que si se encuentra ligado a partículas de pintura, esta degradación es muy inferior, no pudiéndose determinar de forma experimental [90].

Las actividades de mantenimiento, como la limpieza de los cascos de los barcos con agua a presión, y el posterior vertido de la misma al puerto, acarrear una alta cantidad de este tipo de partículas, que pasan a constituir una fuente potencial de estos compuestos al medio circundante. Esta actividad puede ser el motivo fundamental por el cual las muestras de sedimentos procedentes del puerto

## 11. Determinación de biocidas en muestras de sedimentos

---

pesquero de Arguineguín (D3) se caracterizaron, en la mayoría de los casos, por unas concentraciones superiores al resto de muestras. Al tratarse de un puerto pesquero, se mantiene una alta actividad durante todo el año, siendo necesarias las frecuentes tareas de mantenimiento que se llevan a cabo en el área de servicios anexa a los atraques.

En el Muelle Deportivo de Las Palmas de Gran Canaria se encontró asiduamente Diurón en concentraciones no superiores a 7 ng/g, encontrándose relativamente próximo el punto de muestreo (A11) al varadero de dicho puerto. También se halló este biocida esporádicamente en las muestras A8 (puerto deportivo del Real Club Náutico de Gran Canaria) y C4 (puerto deportivo de Puerto Rico), mientras que las muestras A7 (puerto deportivo del Real Club Náutico), B5 y B6 (puerto de Mogán) se caracterizaron por presentar niveles inferiores al límite de detección de la metodología empleada.

***Irgarol 1051.***- Aunque el Irgarol 1051 es el compuesto más hidrofóbico de la familia de las triazinas [74], con un valor de  $\log K_{ow}$  igual a 2.38, diversos estudios sugieren que dicho compuesto muestra una baja afinidad hacia el material particulado [48, 72, 163], encontrándose fundamentalmente en fase disuelta [41, 53, 72, 161, 174]. Por otro lado, presenta una baja degradación, con una vida media en sedimentos marinos y en condiciones aeróbicas de 100 días, siendo esta degradación más lenta en condiciones anaeróbicas [65].

En la figura 11.2 se pueden observar los niveles de Irgarol 1051 determinados en las diferentes muestras. Las concentraciones de Irgarol 1051 encontradas fluctuaron entre niveles inferiores al límite de detección y 23.9 ng/g (muestra D3, Mayo de 2009).

Otros estudios han revelado concentraciones muy superiores a las aquí

---

referenciadas, por ejemplo, en el Reino Unido se han documentado niveles de Irgarol 1051 de hasta 5 006 ng/g [75], 1 011 ng/g [53] y 222 ng/g [35], en Grecia de hasta 690 ng/g [76], en Alemania de hasta 220 ng/g [56], y más recientemente en Francia de hasta 689 ng/g [77]. Sin embargo, los datos aportados por el presente estudio están en concordancia con las observaciones realizadas por diversos autores en otros países [55, 78, 83, 95, 163, 165, 174], y en España [79, 80, 136].

Al igual que en el caso de otros biocidas antiincrustantes, diversos autores consideran la presencia de partículas de pintura como una fuente importante de estos compuestos al medio portuario, viéndose además incrementada la persistencia de los mismos [48, 55, 90]. Probablemente debido a este hecho, fue frecuente la presencia de este compuesto en las muestras procedentes del puerto de Arguineguín (D3) a concentraciones superiores a la del resto de puertos en estudio. También fue asidua su presencia en las muestras procedentes del Muelle Deportivo de Las Palmas de GC (A11) y del puerto deportivo de Puerto Rico (C4), encontrándose de forma esporádica en las muestras procedentes del puerto deportivo del Real Club Náutico (A7 y A8).

***Diclofluanid.***- El Diclofluanid se caracteriza por mostrar una baja solubilidad en agua, con un valor de  $\log K_{ow}$  igual a 3.7, dando lugar a que se adsorba fuertemente sobre el material particulado [94]. Este hecho, junto a la rápida degradación del mismo en el medio acuático marino [48, 97], provoca que sea poco frecuente su presencia en fase disuelta, encontrándose principalmente en el sedimento. Otros autores han descrito este comportamiento con anterioridad [35, 79, 93], coincidiendo con nuestras observaciones.

Los niveles de Diclofluanid encontrados oscilaron entre concentraciones inferiores al límite de detección de la metodología empleada y 16.6 ng/g (D3,

## 11. Determinación de biocidas en muestras de sedimentos

---

Enero de 2009). Se halló en las muestras procedentes del puerto de Arguineguín (D3), del Muelle Deportivo de Las Palmas de Gran Canaria (A11), ambas ubicaciones próximas a las respectivas áreas de reparaciones, y del puerto deportivo de Puerto Rico (C4). En cuanto al resto de muestras, los niveles de este biocida se mantuvieron siempre por debajo del límite de detección de la metodología aplicada. Al igual que para los otros biocidas presentes en las muestras de sedimentos, se achaca a la presencia de partículas de pintura las altas concentraciones determinadas en el puerto pesquero de Arguineguín.

Las concentraciones aquí referenciadas guardan similitud con los niveles hallados por otros autores en Vietnam (hasta 2.6 ng/g) [82], Japón (hasta 14 ng/g) [78] y España (hasta 11 ng/g) [79], aunque también se han encontrado en el Reino Unido concentraciones de hasta 688 ng/g [35] y en Grecia de hasta 195 ng/g [76].

En cuanto a la evolución temporal de las concentraciones de Diurón, Irgarol 1051 y Diclofluanid, no se ha observado ningún patrón de comportamiento apreciable. Como comenta algún autor, esto se debe fundamentalmente a la baja renovación del sedimento en comparación con el agua [75]. Sin embargo, otros autores han observado una marcada variabilidad estacional [35, 76].

## *IV. CONCLUSIONES*

---



## *Conclusiones*

Del trabajo de investigación llevado a cabo en la presente Tesis Doctoral se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- ① La metodología optimizada para la determinación de los diferentes biocidas en muestras de agua de mar se reveló como un procedimiento de fácil aplicación y bajo consumo de tiempo. Los límites de detección alcanzados con las diversas técnicas empleadas (HPLC-DAD, LC-MS/MS) resultaron adecuados para la detección de los biocidas y el método desarrollado se aplicó a numerosas muestras procedentes de diversos puertos de la isla de Gran Canaria.
- ② Mediante el empleo de la detección por absorbancia UV-visible fue posible evaluar la presencia asidua de Diurón en las muestras de agua de mar, mientras que Irgarol 1051 y Clorotalonil se detectaron de forma esporádica. Por otro lado, la detección mediante espectrometría de masas llevada a cabo con un detector de triple cuadrupolo, permitió la determinación de Diurón e Irgarol 1051 en gran parte las muestras recolectadas. Los niveles hallados de estos dos compuestos oscilaron entre unidades y centenas de ng/L.
- ③ El análisis estadístico realizado sobre los niveles de biocidas encontrados en

---

las muestras de agua de mar, reveló que los puertos deportivos presentes en Las Palmas de Gran Canaria (Muelle Deportivo y el puerto deportivo del Real Club Náutico de Gran Canaria), presentaron una concentración media de Diurón significativamente superior al de resto de puertos en estudio. En el caso del Irgarol 1051, todos los puertos deportivos muestreados se caracterizaron también por una concentración media significativamente superior al resto de puertos. Ambos hechos nos llevan a afirmar que los puertos deportivos muestreados presentaron unos mayores niveles de este tipo de compuestos en sus aguas, probablemente debido a las condiciones que se dan en los mismos (gran densidad de embarcaciones y baja circulación de agua). En cuanto a la evolución temporal dentro de cada puerto, decir que, en la mayoría de los casos, no fue posible observar fluctuaciones evidentes que se relacionaran con los diferentes comportamientos y usos a los que se destinan dichos puertos.

- ④ El análisis probabilístico del riesgo ecológico realizado, mostró que, de forma individual, las concentraciones de Diurón e Irgarol 1051 determinadas en el periodo comprendido entre mayo de 2008 y mayo de 2009 no presentaron, en principio, un riesgo evidente para aquellos organismos más sensibles a su presencia (autótrofos).
  
- ⑤ En comparación con otras extracciones convencionales, la metodología optimizada mediante MAE-SPE para la extracción de biocidas antiincrustantes en muestras de sedimentos marinos aportó una mayor rapidez a los análisis y unos límites de detección que resultaron adecuados para la determinación de dichos compuestos en el medio.

- 
- ⑥ Mediante la aplicación de dicha metodología fue posible determinar Diurón, Irgarol 1051 y Diclofluanid en las muestras de sedimentos en concentraciones que oscilaron entre unidades y decenas de ng/g. La presencia de Diclofluanid en estas muestras y no así en las muestras de agua, se relaciona con su baja solubilidad y rápida degradación en el medio, coincidiendo nuestras observaciones con las llevadas a cabo por otros autores.
- ⑦ Se observó una mayor concentración de Diurón, Irgarol 1051 y Diclofluanid en las muestras de sedimentos procedentes del puerto de Arguineguín, debiéndose probablemente este hecho a la presencia de partículas de pintura, siendo la fuente principal de las mismas las diversas actividades de reparación que se realizan en sus instalaciones.

## *V. REFERENCIAS*

---

- [1] Yebra, Diego Meseguer, Soren Kiil y Kim Dam-Johansen: *Antifouling technology—past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings*. Progress in Organic Coatings, 50(2):75 – 104, 2004.
- [2] Champ, Michael A.: *A review of organotin regulatory strategies, pending actions, related costs and benefits*. Science of the Total Environment, 258:21–71, 2000.
- [3] Brancato, MS, D. MacLellan, P. Inc y WA Kirkland: *Impacts of invasive species introduced through the shipping industry*. OCEANS'99 MTS/IEEE. Riding the Crest into the 21st Century, 2:676, 1999.
- [4] Reise, K., S. Gollasch y W.J. Wolff: *Introduced marine species of the North Sea coasts*. Helgoland Marine Research, 52(3):219–234, 1998.
- [5] Callow, M.E. y J.A. Callow: *Marine biofouling: a sticky problem*. Biologist, 49(1):1–5, 2002.
- [6] Almeida, E., T.C. Diamantino y O. de Sousa: *Marine paints: The particular case of antifouling paints*. Progress in Organic Coatings, 59(1):2–20, 2007.

- [7] Lunn, I.: *Antifouling: a brief introduction to the origins and development of the marine antifouling industry*. BCA Publications, 1974.
- [8] Evans, S. M., A. C. Birchenough y M. S. Brancato: *The TBT Ban: Out of the Frying Pan into the Fire?* Marine Pollution Bulletin, 40(3):204 – 211, 2000.
- [9] Hoch, M.: *Organotin compounds in the environment - an overview*. Applied Geochemistry, 16:719–743, 2001.
- [10] Clare, A. S.: *Towards nontoxic antifouling*. Journal of Marine Biotechnology, 6:3–6, 1998.
- [11] Armstrong, E., K.G. Boyd y J.G. Burgess: *Prevention of marine biofouling using natural compounds from marine organisms*. Biotechnology annual review, 6:221–242, 2000.
- [12] Omae, I.: *Organotin antifouling paints and their alternatives*. Applied Organometallic Chemistry, 17:81–105, 2003.
- [13] Londen, AM: *A Study of Ship Bottom Paints, In Particular Pertaining to the Behavior and Action of Antifouling Paints*. TNO, Report, 54, 1963.
- [14] Voulvoulis, N., M. D. Scrimshaw y J. N. Lester: *Alternative Antifouling Biocides*. Applied Organometallic Chemistry, 13:135–143, 1999.
- [15] Blunden, SJ, P. Cusack y R Hill: *Industrial uses of tin chemicals*. The Royal Society of Chemistry: Burlington House, London, 1985.
- [16] Konstantinou, I.K. y T.A. Albanis: *Antifouling paint biocides*. Springer, Berlin, 2006.

- [17] De Mora, SJ: *Tributyltin: case study of an environmental contaminant*, volumen 8. Cambridge Univ Pr, Cambridge, 1996.
- [18] Rouhi, A. M.: *The squeeze in tributyltins*. Chemical Engineering News, páginas 41–42, 1998.
- [19] Alzieu, C.: *Environmental impact of TBT: the French experience*. Science of the Total Environment, 258(1-2):99–102, 2000.
- [20] Evans, SM y GJ Nicholson: *The use of imposex to assess tributyltin contamination in coastal waters and open seas*. Science of the Total Environment, 258(1-2):73–80, 2000.
- [21] Clark, E.A., R.M. Sterritt y J.N. Lester: *The fate of tributyltin in the aquatic environment*. Environmental science & technology, 22(6):600–604, 1988.
- [22] Scrimshaw, MD, R. Wahlen, T. Catterick y JN Lester: *Butyltin compounds in a sediment core from the old Tilbury basin, London, UK*. Marine Pollution Bulletin, 50(12):1500–1507, 2005.
- [23] Huggett, R.J., M.A. Unger, P.F. Seligman y A.O. Valkirs: *ES&T Series: The marine biocide tributyltin. Assessing and managing the environmental risks*. Environmental Science and Technology, 26(2):232–237, 1992.
- [24] Waldock, MJ, JE Thain, D. Smith y S. Milton: *The degradation of TBT in estuarine sediments*. En *Proceedings of the third International Organotin Symposium, Monaco, 17–20 April 1990*, páginas 46–48, 1990.
- [25] De Mora, SJ y E. Pelletier: *Environmental tributyltin research: past, present, future*. Environmental Technology, 18(12):1169–1177, 1997.

- [26] Negri, Andrew y Paul Marshall: *TBT contamination of remote marine environments: Ship groundings and ice-breakers as sources of organotins in the Great Barrier Reef and Antarctica*. Journal of Environmental Management, 90(Supplement 1):S31 – S40, 2009.
- [27] Tanabe, S., M. Prudente, T. Mizuno, Hasegawa J., H. Iwata y N. Miyazaki: *Butyltin Contamination in Marine Mammals from North Pacific and Asian Coastal Waters*. Environmental Science Technology, 32(15):193–198, 1998.
- [28] Takahashi, S., S. Tanabe y T. Kubodera: *Butyltin residues in deep-sea organisms collected from Suruga Bay, Japan*. Environmental Science Technology, 31(11):3103–3109, 1997.
- [29] Gipperth, L.: *The legal design of the international and European Union ban on tributyltin antifouling paint: Direct and indirect effects*. Journal of Environmental Management, 90:86–95, 2009.
- [30] Chambers, L.D., K.R. Stokes, F.C. Walsh y R.J.K. Wood: *Modern approaches to marine antifouling coatings*. Surface and Coatings Technology, 201(6):3642 – 3652, 2006.
- [31] Champ, M.A.: *The need for the formation of an independent, international marine coatings board*. Marine Pollution Bulletin, 38(4):239–246, 1999.
- [32] MAS3-CT98-00178., European Commission Project.  
<http://www.pml-ace.org.uk/>.
- [33] *Health and Safety Executive, Information Document HSE 730/15:13*, 2002.
- [34] *European Directive 2455/2001*, 2001.



- [35] Voulvoulis, Nikolaos, Mark D. Scrimshaw y John N. Lester: *Occurrence of Four Biocides Utilized in Antifouling Paints, as Alternatives to Organotin Compounds, in Waters and Sediments of a Commercial Estuary in the UK*. Marine Pollution Bulletin, 40(11):938 – 946, 2000.
- [36] Zondlo Fiume, Monice: *Final report on the safety assessment of p-Chloro-m-Cresol*. International Journal of Toxicology, 16:235–268, 1997.
- [37] Thomas, K. V.: *The Environmental Fate and Behaviour of Antifouling Paint Booster Biocides: a Review*. Biofouling, 17:73–86, 2001.
- [38] Sharma, V. K., J. S. Aulakh y A. K. Malik: *Thiram: degradation, applications and analytical methods*. Journal of Environmental Monitoring, 5:717–723, 2003.
- [39] Council, B.B.C.P.: *The pesticide manual (Tomlin CDS, Ed.)*. 1997.
- [40] López-Roldán, P., MJ López de Alda y D. Barceló: *Simultaneous determination of selected endocrine disrupters (pesticides, phenols and phthalates) in water by in-field solid-phase extraction (SPE) using the prototype PROFEXS followed by on-line SPE (PROSPEKT) and analysis by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation-mass spectrometry*. Analytical and bioanalytical chemistry, 378(3):599–609, 2004.
- [41] Hall Jr, LW, JM Giddings, KR Solomon y R. Balcomb: *An ecological risk assessment for the use of Irgarol 1051 as an algaecide for antifoulant paints*. Critical Reviews in Toxicology, 29(4):367–437, 1999.

- [42] Van Hattum, B., AC Baart, JG Boon, R. Steen y F. Ariese: *Computer model to generate predicted environmental concentrations (PEC's) for antifouling products in the marine environment*, 1999.
- [43] Readman, J.W., L.L. Wee Knong, D. Grondin, J. Barocci, L.P. Vileneuve y L.D. Mee: *Coastal water contamination from a triazine herbicide used in antifouling paints*. *Environmental Science and Technology*, 27:1940–1942, 1993.
- [44] Dahl, B y H Blanck: *Toxic effects of the antifouling agent Irgarol 1051 on periphyton communities in coastal water microcosms*. *Marine Pollution Bulletin*, 32:342–350, 1996.
- [45] Scarlett, A., P. Donkin, T.W. Fileman, S.V. Evans y M.E. Donkin: *Risk posed by the antifouling agent Irgarol 1051 too the seagrass Zostera marina*. *Aquatic Toxicology*, 45:159–170, 1999.
- [46] Wezel, A. P. van y P. van Vlaardingen: *Environmental risk limits for antifouling substances*. *Aquatic Toxicology*, 66:427–444, 2004.
- [47] Okamura, H., I. Aoyama, D. Liu, J. Maguire, G. J. Pacepavicius y Y. L. Lau: *Photodegradation of irgarol 1051 in water*. *Journal of Environmental Science and Health. Part B*, 34:225–238, 1999.
- [48] Thomas, K. V., M. McHugh y M. Waldock: *Antifouling paint booster biocides in UK coastal waters: inputs, occurrence and environmental fate*. *Science of the Total Environment*, 293:117–127, 2002.
- [49] Callow, M.E. y G.L. Willingham: *Degradation of antifouling biocides*. *Biofouling*, 10:239–249, 1996.

- [50] Harino, H., M. Kitano, Y. Mori, K. Mochida, A. Kakuno y S. Arima: *Degradation of antifouling booster biocides in water*. Journal of the Marine Biology Association of the United Kingdom, 85:33–38, 2005.
- [51] Lam, Ka Ho, Zongwei Cai, Ho Yin Wai, Vic Wing Hang Tsang, Michael Hon Wah Lam, Richard Yun Hing Cheung, HongXia Yu y Paul Kwan Sing Lam: *Identification of a new Irgarol-1051 related s-triazine species in coastal waters*. Environmental Pollution, 136(2):221 – 230, 2005.
- [52] Thomas, Kevin V., Tim W. Fileman, James W. Readman y Mike J. Waldock: *Antifouling Paint Booster Biocides in the UK Coastal Environment and Potential Risks of Biological Effects*. Marine Pollution Bulletin, 42(8):677 – 688, 2001.
- [53] Boxall, A. B. A., S. D. Comber, A. U. Conrad, J. Howcroft y N. Zaman: *Inputs, Monitoring and Fate Modelling of Antifouling Biocides in UK Estuaries*. Marine Pollution Bulletin, 40(11):898 – 905, 2000.
- [54] Gatidou, Georgia, Nikolaos S. Thomaidis y John L. Zhou: *Fate of Irgarol 1051, diuron and their main metabolites in two UK marine systems after restrictions in antifouling paints*. Environment International, 33(1):70 – 77, 2007.
- [55] Zhou, John L.: *Occurrence and persistence of antifouling biocide Irgarol 1051 and its main metabolite in the coastal waters of Southern England*. Science of the Total Environment, 406(1-2):239 – 246, 2008.
- [56] Biselli, S., K. Bester, H. Hühnerfuss y K. Fent: *Concentrations of the Antifouling Compound Irgarol 1051 and of Organotins in Water and*

- Sediments of German North and Baltic Sea Marinas*. Marine Pollution Bulletin, 40:233–243, 2000.
- [57] Gatidou, Georgia, Anna Kotrikla, Nikolaos S. Thomaidis y Themistokles D. Lekkas: *Determination of the antifouling booster biocides irgarol 1051 and diuron and their metabolites in seawater by high performance liquid chromatography-diode array detector*. Analytica Chimica Acta, 528(1):89 – 99, 2005.
- [58] Lamoree, M. H., C. P. Swart, A. van der Horst y B. van Hattum: *Determination of diuron and the antifouling paint biocide Irgarol 1051 in Dutch marinas coastal waters*. Journal of Chromatography A, 970:183–190, 2002.
- [59] Landa, G. Di, L. Parrella, S. Avagliano, G. Ansanelli, E. Maiello y C. Cremisini: *Assessment of the Potential Ecological Risks Posed by Antifouling Booster Biocides to the Marine Ecosystem of the Gulf of Napoli (Italy)*. Water, Air, & Soil Pollution, 200:305–321, 2009.
- [60] Harino, H., Y. Mori, Y. Yamaguchi, K. Shibata y T. Senda: *Monitoring of Antifouling Booster Biocides in Water and Sediment from the Port of Osaka, Japan*. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 48:303–310, 2005.
- [61] Basheer, C., K. S. Tan y H.K. Lee: *Organotin and Irgarol-1051 contamination in Singapore coastal waters*. Marine Pollution Bulletin, 44:697–703, 2002.

- [62] Carbery, Kelly, Richard Owen, Trish Frickers, Ernesto Otero y James Readman: *Contamination of Caribbean coastal waters by the antifouling herbicide Irgarol 1051*. Marine Pollution Bulletin, 52(6):635 – 644, 2006.
- [63] Sapozhnikova, Yelena, Edward Wirth, Nan Singhasemanon, Juanita Bacey y Michael Fulton: *Distribution of antifouling biocides in California marinas*. Journal of Environmental Monitoring, 10:1069–1075, 2008.
- [64] Owen, R., A. Knap, M. Toasperm y Carberry K.: *Inhibition of coral photosynthesis by the antifouling herbicide Irgarol 1051*. Marine Pollution Bulletin, 44:623–632, 2002.
- [65] Tóth, S., K. Becker van Slooten, L. Spack, L. F. de Alencastro y J. Tarradellas: *Irgarol 1051, and Antifouling Compound in Freshwater, Sediment, and Biota of Lake Geneva*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 57:426–433, 1996.
- [66] Almeida Azevedo, Débora de, Sílvia Lacorte, Tereza Vinhas, Paula Viana y Damià Barceló: *Monitoring of priority pesticides and other organic pollutants in river water from Portugal by gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 879(1):13 – 26, 2000.
- [67] Pocurull, E., L. Brossa, F. Borrull y R. M. Marcé: *Trace determination of antifouling compounds by on-line solid-phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 885(1-2):361 – 368, 2000.

- [68] Ferrer, I., B. Ballesteros, M. P. Marco y D. Barceló: *Pilot Survey for Determination of the Antifouling Agent Irgarol 1051 in Enclosed Seawater Samples by a Direct Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Solid-Phase Extraction Followed by Liquid Chromatography-Diode Array Detection*. Environmental Science and Technology, 31:3530–3535, 1997.
- [69] Hernando, María Dolores, Luis Piedra, Ángel Belmonte, Ana Agüera y Amadeo R. Fernández-Alba: *Determination of traces of five antifouling agents in water by gas chromatography with positive/negative chemical ionisation and tandem mass spectrometric detection*. Journal of Chromatography A, 938(1-2):103 – 111, 2001.
- [70] Agüera, Ana, Luis Piedra, María Dolores Hernando y Amadeo R. Fernández-Alba: *Multiresidue method for the analysis of five antifouling agents in marine and coastal waters by gas chromatography-mass spectrometry with large-volume injection*. Journal of Chromatography A, 889(1-2):261 – 269, 2000.
- [71] Comber, S. D. W., G. Franklin, M. J. Gardner, C. D. Watts, A. B. A. Boxall y J. Howcroft: *Partitioning of marine antifoulants in the marine environment*. The Science of The Total Environment, 286(1-3):61 – 71, 2002.
- [72] Tolosa, I., J. W. Readman, A. Blaevoet, S. Ghilini, J. Bartocci y M. Horvat: *Contamination of Mediterranean (Côte d’Azur) Coastal Waters by Organotins and Irgarol 1051 Used in Antifouling Paints*. Marine Pollution Bulletin, 32:335–341, 1996.
- [73] Lambropoulou, D. A., V. A. Sakkas y T. A. Albanis: *Partitioning of antifouling agents, irgarol 1051 and sea nine 211, to humic organic*

- matter investigated by solid-phase microextraction.* International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 84:47–54, 2004.
- [74] Konstantinou, I. K. y T. A. Albanis: *Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: a review.* Environment International, 30(2):235 – 248, 2004.
- [75] Comber, S. D. W., M. J. Gardner y A. B. A. Boxall: *Survey of four marine antifoulant constituents (cooper, zinc, diuron and Irgarol 1051) in two UK estuaries.* Journal of Environmental Monitoring, 4:417–425, 2002.
- [76] Albanis, T. A., D. A. Lambropoulou, V. A. Sakkas y I. K. Konstantinou: *Antifouling paint booster biocide contamination in Greek marine sediments.* Chemosphere, 48(5):475 – 485, 2002.
- [77] Cassi, Roberto, Imma Tolosa y Stephen de Mora: *A survey of antifoulants in sediments from Ports and Marinas along the French Mediterranean coast.* Marine Pollution Bulletin, 56(11):1943 – 1948, 2008.
- [78] Harino, H., Y. Yamamoto, S. Eguchi, S. Kawai, Y. Kurokawa, T. Arai, M. Ohji, H. Okamura y N. Miyazaki: *Concentrations of Antifouling Biocides in Sediments and Mussel Samples Collected from Otsuchi Bay, Japan.* Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 52:179–188, 2007.
- [79] Martínez, K. y D. Barceló: *Determination of antifouling pesticides and their degradation products in marine sediments by means of ultrasonic extraction and HPLC-ACPI-MS.* Fresenius J. Anal. Chem., 370:940–945, 2001.
- [80] Carrasco, Pilar Bou, Sergi Díez, Jasmina Jiménez, María Pilar Marco y Josep M. Bayona: *Determination of Irgarol 1051 in Western*

- Mediterranean sediments. Development and application of supercritical fluid extraction-immunoaffinity chromatography procedure.* Water Research, 37(15):3658 – 3665, 2003.
- [81] Scarlett, A., P. Donkin, T. W. Fileman y R. J. Morris: *Occurrence of the Antifouling Herbicide, Irgarol 1051, within Coastal-water Seagrasses from Queensland, Australia.* Marine Pollution Bulletin, 38(8):687 – 691, 1999.
- [82] Harino, H., S. Midorikawa, T. Arai, M. Ohji, N. Duc Cu y N. Miyazaki: *Concentrations of booster biocides in sediments and clams from Vietnam.* Journal of the Marine Biology Association of the United Kingdom, 86:1163–1170, 2006.
- [83] Tsang, V. W., N. Lei y M.H. Lam: *Determination of Irgarol-1051 and its related s-triazine species in coastal sediments and mussel tissues by HPLC-ESI-MS/MS.* Marine Pollution Bulletin, 58:1462–1471, 2009.
- [84] Martínez, K., I. Ferrer y D. Barceló: *Part-per-trillon level determination of antifouling pesticides and their byproducts in seawater samples by off-line solid-phase extraction followed by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry.* Journal of Chromatography A, 879:27–37, 2000.
- [85] Albanis, TA: *Runoff losses of EPTC, molinate, simazine, diuron, propanil and metolachlor in Thermaikos Gulf, N. Greece.* Chemosphere, 22(7):645–653, 1991.



- [86] Fernández-Alba, A. R., M. D. Hernando, L. Piedra y Y. Chisti: *Toxicity evaluation of single and mixed antifouling biocides measured with acute toxicity bioassays*. *Analytica Chimica Acta*, 456:303–312, 2002.
- [87] Haynes, D., P. Ralph, J. Prange y B. Dennison: *The impact of the herbicide Diuron on photosynthesis in three species of tropical seagrass*. *Marine Pollution Bulletin*, 41:288–293, 2000.
- [88] Giacomazzi, S. y N. Cochet: *Environmental impact of diuron transformation: a review*. *Chemosphere*, 56(11):1021 – 1032, 2004.
- [89] Okamura, H.: *Photodegradation of the antifouling compounds Irgarol 1051 and Diuron released from a commercial antifouling paint*. *Chemosphere*, 48(1):43 – 50, 2002.
- [90] Thomas, Kevin V., Mathew McHugh, Martin Hilton y Mike Waldock: *Increased persistence of antifouling paint biocides when associated with paint particles*. *Environmental Pollution*, 123(1):153 – 161, 2003.
- [91] Okamura, H., I. Aoyama, Y. Ono y T. Nishida: *Antifouling herbicides in the coastal waters of western Japan*. *Marine Pollution Bulletin*, 47:59–67, 2003.
- [92] Landa, Giuseppe Di, Giuliana Ansanelli, Roberto Ciccoli y Carlo Cremisini: *Occurrence of antifouling paint booster biocides in selected harbors and marinas inside the Gulf of Napoli: A preliminary survey*. *Marine Pollution Bulletin*, 52(11):1541 – 1546, 2006.
- [93] Ferrer, Imma y Damià Barceló: *Simultaneous determination of antifouling herbicides in marina water samples by on-line solid-phase extraction followed*

- by liquid chromatography-mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 854(1-2):197 – 206, 1999.
- [94] Voulvoulis, N., M. D. Scrimshaw y J. N. Lester: *Partitioning of selected antifouling biocides in the aquatic environment*. Marine Environmental Research, 53(1):1 – 16, 2002.
- [95] Thomas, K. V., S. J. Blake y M. J. Waldock: *Antifouling Paint Booster Biocide Contamination in UK Marine Sediments*. Marine Pollution Bulletin, 40:739–745, 2000.
- [96] Harino, H., M. Ohji, G. Wattayakorn, T. Arai, S. Rungsupa y N. Miyazaki: *Occurrence of Antifouling Biocides in Sediments and Green Mussels from Thailand*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 51:400–407, 2006.
- [97] Callow, M. F. y J. A. Finlay: *A simple method to evaluate the potential for degradation of antifouling biocides*. Biofouling, 9:153–165, 1995.
- [98] Sakkas, Vasilios A., Ioannis K. Konstantinou y Triantafyllos A. Albanis: *Photodegradation study of the antifouling booster biocide dichlofluanid in aqueous media by gas chromatographic techniques*. Journal of Chromatography A, 930(1-2):135 – 144, 2001.
- [99] Sakkas, V. A., I. K. Konstantinou, D. A. Lambropoulou y T. A. Albanis: *Survey for the Occurrence of Antifouling Paint Booster Biocides in the Aquatic Environment of Greece*. Environmental Science & Pollution Research, 9:327–332, 2002.

- [100] Hamwijk, C., A. Schouten, E. M. Foekema, J. C. Ravensberg, M. T. Collombon, K. Schmidt y M. Kugler: *Monitoring of the booster biocide dichlofluanid in water and marine sediment of Greek marinas*. Chemosphere, 60:1316–1324, 2005.
- [101] Gimeno, R. A., C. Aguilar, R. M. Marcé y F. Borrull: *Monitoring of antifouling agents in water samples by on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 915(1-2):139 – 147, 2001.
- [102] Piedra, L., A. Tejedor, M. D. Hernando, A. Agüera, D. Barceló y A. Fernández-Alba: *Screening of Antifouling Pesticides in Sea Water Samples at Low ppt Levels by GC-MS and LC-MS*. Chromatographia, 52:631–638, 2000.
- [103] Sakkas, Vasilios A., Dimitra A. Lambropoulou y Triantafyllos A. Albanis: *Study of chlorothalonil photodegradation in natural waters and in the presence of humic substances*. Chemosphere, 48(9):939 – 945, 2002.
- [104] Peñuela, G. A., I. Ferrer y D. Barceló: *Identification of new photodegradation byproducts of the antifouling agent irgarol in seawater samples*. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 78:25–40, 2000.
- [105] Thomas, Kevin V.: *Determination of selected antifouling booster biocides by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 825(1):29 – 35, 1998.

- [106] Sapozhnikova, Yelena, Edward Wirth, Kenneth Schiff, Jeffrey Brown y Michael Fulton: *Antifouling pesticides in the coastal waters of Southern California*. Marine Pollution Bulletin, 54(12):1972 – 1978, 2007.
- [107] Peñalver, A., E. Pocurull, F. Borrull y R. M. Marcé: *Solid-phase microextraction of the antifouling Irgarol 1051 and the fungicides dichlofluanid and 4-chloro-3-methylphenol in water samples*. Journal of Chromatography A, 839:253–260, 1999.
- [108] Lacorte, S., P. Viana, M. Guillamon, R. Tauler, T. Vinhas y D. Barceló: *Main findings and conclusions of the implementation of Directive 76/464/CEE concerning the monitoring of organic pollutants in surface waters (Portugal, April 1999-May 2000)*. Journal of Environmental Monitoring, 3:475–482, 2001.
- [109] Galcerán, M.T. y O. Jáuregui: *Determination of phenols in sea water by liquid chromatography with electrochemical detection after enrichment by using solid-phase extraction cartridges and disks*. Analytica Chimica Acta, 304(1):75–84, 1995.
- [110] Okamura, H., T. Nishida, Y. Ono y W. J. Shim: *Phytotoxic Effects of Antifouling Compounds on Nontarget Plant Species*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 71:881–886, 2003.
- [111] Solomon, K., J. Giesy y P. Jones: *Probabilistic risk assessment of agrochemicals in the environment*. Crop Protection, 19(8-10):649–655, 2000.

- [112] (EPA), Environmental Protection Agency: *Ecological Risk Assessment & the Ecological Technical Center*. <http://www.epa.gov/R5Super/ecology/index.html>.
- [113] ECOFRAM: *Ecological Committee on FIFRA risk assessment methods: Report of the Aquatic Workgroup*. 1999.
- [114] Solomon, K.R., D.B. Baker, R.P. Richards, K.R. Dixon, S.J. Klaine, T.W. La Point, R.J. Kendall, C.P. Weisskopf, J.M. Giddings, J.P. Giesy y cols.: *Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15(1):31–76, 1996.
- [115] Giesy, JP, KR Solomon, JR Coats, K. Dixon, J. Giddings y EE Kenaga: *Ecological risk assessment of chlorpyrifos in North American aquatic environments*. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 160:1–129, 1999.
- [116] Cardwell, R.D., M.S. Brancato, J. Toll, D. DeForest y L. Tear: *Aquatic ecological risks posed by tributyltin in United States surface waters: Pre-1989 to 1996 data*. *Environmental toxicology and chemistry*, 18(3):567–577, 1999.
- [117] Chen, C.S.: *Ecological risk assessment for aquatic species exposed to contaminants in Keelung River, Taiwan*. *Chemosphere*, 61(8):1142–1158, 2005.
- [118] Wang, L., Z. Yang, J. Niu y J. Wang: *Characterization, ecological risk assessment and source diagnostics of polycyclic aromatic hydrocarbons in water column of the Yellow River Delta, one of the most plenty biodiversity zones in the world*. *Journal of Hazardous Materials*, 169:460–465, 2009.

- [119] Christensen, A.M., B. Markussen, A. Baun y B. Halling-Sørensen: *Probabilistic environmental risk characterization of pharmaceuticals in sewage treatment plant discharges*. Chemosphere, 77(3):351–358, 2009.
- [120] Hall, L. W. y P. Gardinali: *Ecological Risk Assessment for Irgarol 1051 and Its Major Metabolite in United States Surface Waters*. Human and Ecological Risk Assessment, 10:525–542, 2004.
- [121] Hall, Lenwood W., William D. Killen, Ronald D. Anderson, Richard Balcomb y Piero Gardinali: *Ecological risk of Irgarol 1051 and its major metabolite in coastal California marinas and reference areas*. Marine Pollution Bulletin, 58(5):702 – 710, 2009.
- [122] Sargent, C. J., J. C. Bowman y J. L. Zhou: *Levels of antifoulant irgarol 1051 in the Conwy Marina, North Wales*. Chemosphere, 41:1755–1760, 2000.
- [123] Liu, D., G. J. Pacepavicius, R. J. Maguire, Y. L. Lau, H. Okamura y I. Aoyama: *Survey for the occurrence of the new antifouling compound irgarol 1051 in the aquatic environment*. Water Research, 33:2833–2843, 1999.
- [124] Connelly, Douglas P., James W. Readman, Anthony H. Knap y Jeremy Davies: *Contamination of the Coastal Waters of Bermuda by Organotins and the Triazine Herbicide Irgarol 1051*. Marine Pollution Bulletin, 42(5):409 – 414, 2001.
- [125] Gardinali, Piero R., Manolo Plasencia, Steve Mack y Charles Poppell: *Occurrence of IRGAROL 1051 in coastal waters from Biscayne Bay, Florida, USA*. Marine Pollution Bulletin, 44(8):781 – 788, 2002.

- [126] Cresswell, Thomas, Jonathan P. Richards, Gillian A. Glegg y James W. Readman: *The impact of legislation on the usage and environmental concentrations of Irgarol 1051 in UK coastal waters*. Marine Pollution Bulletin, 52(10):1169 – 1175, 2006.
- [127] Hall, L. W., W. D. Killen, R. D. Anderson and P. R. Gardinali y R. Balcomb: *Monitoring of Irgarol 1051 concentrations with concurrent phytoplankton evaluations in East Coast areas of the United States*. Marine Pollution Bulletin, 50:668–681, 2005.
- [128] Lambropoulou, D. A., I. K. Konstantinou y T. A. Albanis: *Determination of fungicides in natural waters using solid-phase microextraction and gas chromatography coupled with electron-capture and mass spectrometric detection*. Journal of Chromatography A, 893:143–156, 2000.
- [129] Lambropoulou, D. A., V. A. Sakkas y T. A. Albanis: *Headspace solid phase microextraction for the analysis of the new antifouling agents Irgarol 1051 and Sea Nine 211 in natural waters*. Analytica Chimica Acta, 468:171–180, 2002.
- [130] Lambropoulou, D. A. y T. A. Albanis: *Application of solvent microextraction in a single drop for the determination of new antifouling agents in waters*. Journal of Chromatography A, 1049:17–23, 2004.
- [131] Hennion, M.C.: *Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 856(1-2):3–54, 1999.

- [132] Poole, C.F.: *New trends in solid-phase extraction*. Trends in Analytical Chemistry, 22(6):362–373, 2003.
- [133] Masqué, N., RM Marcé y F. Borrull: *New polymeric and other types of sorbents for solid-phase extraction of polar organic micropollutants from environmental water*. Trends in Analytical Chemistry, 17(6):384–394, 1998.
- [134] Camel, V.: *Extraction techniques*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 372(1):39–40, 2002.
- [135] Zwir-Ferenc, A. y M. Biziuk: *Solid Phase Extraction Technique-Trends, Opportunities and Applications*. Polish Journal of Environmental Studies, 15(5):677, 2006.
- [136] Ferrer, Imma y Damià Barceló: *Identification of a new degradation product of the antifouling agent Irgarol 1051 in natural samples*. Journal of Chromatography A, 926(1):221 – 228, 2001.
- [137] Steen, R. J. C. A., P. E. G. Leonards, U. A. Th. Brinkman y W. P. Cofino: *Ultra-trace-level determination of the antifouling agent Irgarol 1051 by gas chromatography with tandem mass spectrometric detection*. Journal of Chromatography A, 766:153–158, 1997.
- [138] Steen, R. J. C. A., F. Ariese, B. van Hattum, J. Joacobsen y A. Jacobson: *Monitoring and evaluation of the environmental dissipation of the marine antifoulant 4,5-dichloro-2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one (DCOIT) in Danish Harbor*. Chemosphere, 57:513–521, 2004.
- [139] Gatidou, G., J. L. Zhou y N. S. Thomaidis: *Microwave-assisted extraction of Irgarol 1051 and its main degradation product from marine sediments using*



- water as the extractant followed by gas chromatography-mass spectrometry determination.* Journal of Chromatography A, 1046:41–48, 2004.
- [140] Lambropoulou, D. A., V. A. Sakkas y T. A. Albanis: *Determination of antifouling compounds in marine sediments by solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry.* Journal of Chromatography A, 1010:1–8, 2003.
- [141] Camel, V.: *Recent extraction techniques for solid matrices-supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls.* The Analyst, 126(7):1182–1193, 2001.
- [142] Eskilsson, CS y E. Björklund: *Analytical-scale microwave-assisted extraction.* Journal of Chromatography A, 902(1):227, 2000.
- [143] Abu-Samra, A., J.S. Morris y SR Koirtyohann: *Wet ashing of some biological samples in a microwave oven.* Analytical Chemistry, 47(8):1475–1477, 1975.
- [144] Ganzler, K., A. Salgó y K. Valkó: *Microwave extraction. A novel sample preparation method for chromatography.* Journal of Chromatography, 371:299–306, 1986.
- [145] Bélanger, J.M.R. y J.R.J. Paré: *Applications of microwave-assisted processes (MAP<sup>TM</sup>) to environmental analysis.* Analytical and Bioanalytical Chemistry, 386(4):1049–1058, 2006.
- [146] Letellier, M. y H. Budzinski: *Microwave assisted extraction of organic compounds.* Analisis, 27(3):259–270, 1999.

- [147] Andreu, V. y Y. Picó: *Determination of pesticides and their degradation products in soil: critical review and comparison of methods*. Trends in Analytical Chemistry, 23(10-11):772–789, 2004.
- [148] Lambropoulou, D. A., V. A. Sakkas y T. A. Albanis: *Analysis of antifouling biocides Irgarol 1051 and Sea Nine 211 in environmental water samples using solid-phase microextraction and gas chromatography*. Journal of Chromatography A, 952:215–227, 2002.
- [149] Gardinali, Piero R., Manolo D. Plasencia y Charles Maxey: *Occurrence and transport of Irgarol 1051 and its major metabolite in coastal waters from South Florida*. Marine Pollution Bulletin, 49(11-12):1072 – 1083, 2004.
- [150] Voulvoulis, N., M. D. Scrimshaw y J. N. Lester: *Analytical Method Development for the Determination of Four Biocides Used in Antifouling Paints in Estuarine Waters and Sediments by Gas Chromatography-Mass Spectrometry*. Chromatographia, 50:353–357, 1999.
- [151] Gatidou, G., A. Kortrikla, N. S. Thomaidis y T. D. Lekkas: *Determination of two antifouling booster biocides and their degradation products in marine sediments by high performance liquid chromatography-diode array detection*. Analytica Chimica Acta, 505:153–159, 2004.
- [152] BOC núm. 239, sábado 5 de diciembre de 2009.
- [153] <http://www.palmasport.es>.
- [154] Sauerlandt, W. y H. Berwecke: *Untersuchungen über den Nährstoff- und Kohlenstoffgehalt des Stalldüngers*. Z. Pflanzenernähr., Düng., Bodenkunde, 56:204–226, 1952.

- [155] Bisutti, I., I. Hilke y M. Raessler: *Determination of total organic carbon—an overview of current methods*. Trends in Analytical Chemistry, 23(10-11):716–726, 2004.
- [156] R Development Core Team: *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2009. <http://www.R-project.org>, ISBN 3-900051-07-0.
- [157] Lindsay, S.: *High Performance Liquid Chromatography*. Wiley, New York, 1992.
- [158] Martínez, K., I. Ferrer, D. Hernando, A. R. Fernández-Alba, R. M. Marcé, F. Borrull y D. Barceló: *Occurrence of antifouling biocides in the spanish mediterranean marine environment*. Environmental Technology, 22:543–552, 2001.
- [159] Kuster, M., M.J. López de Alda, C. Barata, D. Raldúa y D. Barceló: *Analysis of 17 polar to semi-polar pesticides in the Ebro river delta during the main growing season of rice by automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Talanta, 75:390–401, 2008.
- [160] *Commission Decision 2002/657/CE*, 2002.
- [161] Rogers, HR, CD Watts y I. Johnson: *Comparative predictions of Irgarol 1051 and atrazine fate and toxicity*. Environmental Technology, 17(5):553–556, 1996.
- [162] Scarlett, A., ME Donkin, TW Fileman y P. Donkin: *Occurrence of the marine antifouling agent Irgarol 1051 within the Plymouth Sound locality:*

- implications for the green macroalga Enteromorpha intestinalis*. Marine Pollution Bulletin, 34(8):645–651, 1997.
- [163] Gough, M.A., J. Fothergill y J.D. Hendrie: *A survey of southern England coastal waters for the s-triazine antifouling compound Irgarol 1051*. Marine Pollution Bulletin, 28(10):613–620, 1994.
- [164] Tolosa, I. y JW Readman: *Simultaneous analysis of the antifouling agents: tributyltin, triphenyltin and IRGAROL 1051 in marina water samples*. Analytica Chimica Acta, 335(3):267–274, 1996.
- [165] Bowman, J. C., J. W. Readman y J. L. Zhou: *Seasonal variability in the concentrations of Irgarol 1051 in Brighton Marina, UK; including the impact of dredging*. Marine Pollution Bulletin, 46(4):444 – 451, 2003.
- [166] Koutsaftis, A. y I. Aoyama: *The interactive effects of binary mixtures of three antifouling biocides and three heavy metals against the marine algae Chaetoceros gracilis*. Environmental Toxicology and Water Quality, 21(4):432–439, 2006.
- [167] Chesworth, J. C., M. E. Donkin y M. T. Brown: *The interactive effects of the antifouling herbicides Irgarol 1051 and Diuron on the seagrass Zostera marina (L.)*. Aquatic Toxicology, 66(3):293 – 305, 2004.
- [168] Wang, B., G. Yu, J. Huang, Y. Yu, H. Hu y L. Wang: *Tiered aquatic ecological risk assessment of organochlorine pesticides and their mixture in Jiangsu reach of Huaihe River, China*. Environmental Monitoring and Assessment, 157(1):29–42, 2009.

- [169] Sun, L. y H.K. Lee: *Optimization of microwave-assisted extraction and supercritical fluid extraction of carbamate pesticides in soil by experimental design methodology*. Journal of Chromatography A, 1014(1-2):165–177, 2003.
- [170] Bouaid, A., A. Martin-Esteban, P. Fernandez y C. Camara: *Microwave-assisted extraction method for the determination of atrazine and four organophosphorus pesticides in oranges by gas chromatography (GC)*. Fresenius' journal of analytical chemistry, 367(3):291–294, 2000.
- [171] Gfrerer, M. y E. Lankmayr: *Screening, optimization and validation of microwave-assisted extraction for the determination of persistent organochlorine pesticides*. Analytica Chimica Acta, 533(2):203–211, 2005.
- [172] Fuentes, E., M.E. Báez y D. Reyes: *Microwave-assisted extraction through an aqueous medium and simultaneous cleanup by partition on hexane for determining pesticides in agricultural soils by gas chromatography: A critical study*. Analytica chimica acta, 578(2):122–130, 2006.
- [173] Zuloaga, O., N. Etxebarria, L.A. Fernández y J.M. Madariaga: *Optimization and comparison of MAE, ASE and Soxhlet extraction for the determination of HCH isomers in soil samples*. Fresenius' journal of analytical chemistry, 367(8):733–737, 2000.
- [174] Haglund, K., A. Pettersson, M. Peterson, H. Kylin, S. C. Lord y P. Dollenmeier: *Seasonal Distribution of the Antifouling Compound Irgarol 1051 Outside a Marina in the Stockholm Archipelago*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 66:50–58, 2001.

## Índice de tablas

1.1	Etapas de la incrustación biológica. . . . .	7
1.2	Niveles de TBT de efectos no observados sobre especies no objetivo. . . . .	12
1.3	Algunos de los <i>booster biocides</i> más utilizados. . . . .	14
1.4	Compuestos antiincrustantes objeto de estudio. . . . .	16
1.5	Diferentes usos de los compuestos en de estudio. . . . .	18
1.6	Tasas de liberación. . . . .	19
1.7	Propiedades fisico-químicas de los compuestos objeto de estudio. . . . .	20
5.1	Muestras de agua de mar recolectadas. . . . .	63
5.2	Muestras de sedimentos recolectadas. . . . .	64
6.1	Porcentaje de materia orgánica en las muestras de sedimentos. . . . .	79
7.1	Niveles de toxicidad empleados en la evaluación del riesgo ecológico. . . . .	84
8.1	Tiempos de retención y longitudes de onda empleadas. . . . .	104
8.2	Parámetros analíticos obtenidos mediante SPE-HPLC. . . . .	106
8.3	Condiciones óptimas para la determinación de los analitos mediante MS/MS. . . . .	111
8.4	Parámetros analíticos obtenidos mediante SPE-LC-MS/MS. . . . .	114

9.1	Parámetros estadísticos descriptivos de los niveles de Diurón en muestras de agua. . . . .	119
9.2	Ajuste del conjunto de datos de toxicidad. . . . .	137
9.3	Ajuste del conjunto de datos de exposición. . . . .	138
9.4	Probabilidades de excedencia y áreas relativas. . . . .	141
10.1	Diseño factorial $2^3$ . . . . .	154
10.2	Correlaciones parciales y bivariadas. . . . .	155
10.3	Diseño factorial $3^2$ . . . . .	156
10.4	Parámetros analíticos obtenidos mediante MAE-SPE-LC-MS/MS. . . . .	160
A.1	Niveles de Diurón e Irgarol 1051 determinados en muestras de agua de mar mediante SPE-HPLC-DAD. . . . .	215
A.2	Niveles de Diurón e Irgarol 1051 determinados en muestras de agua de mar mediante SPE-LC-MS/MS. . . . .	220
A.3	Niveles de Diurón, Irgarol 1051 y Diclofluanid determinados en muestras de sedimentos mediante MAE-SPE-LC-MS/MS. . . . .	229

## *Índice de figuras*

1.1	Casco de un barco afectado por bioincrustaciones. . . . .	6
1.2	Compuestos antiincrustantes objeto de estudio. . . . .	17
1.3	Procesos que afectan a los biocidas antiincrustantes en el medio marino. . . . .	20
1.4	Distribuciones log-normales de datos de exposición y toxicidad. . .	33
2.1	Etapas de la extracción en fase sólida. . . . .	38
4.1	Sistemas cromatográficos empleados. . . . .	56
4.2	Microondas. . . . .	57
4.3	Sistema de SPE. . . . .	58
5.1	Puntos de muestreo. . . . .	62
5.2	Puerto de Las Palmas de Gran Canaria. . . . .	65
5.3	Muelle Deportivo. . . . .	67
5.4	Sacan (embarcación empleada para el muestreo de aguas). . . . .	70
5.5	Draga Van Veen. . . . .	71
7.1	Linealización de datos de exposición y toxicidad. . . . .	87
7.2	Empleo de curvas de probabilidad conjunta. . . . .	88



8.1	Áreas obtenidas mediante el empleo de diferentes fases sólidas. . . . .	97
8.2	Áreas obtenidas mediante el empleo de diferentes composiciones del disolvente de lavado. . . . .	99
8.3	Áreas obtenidas mediante el empleo de diferentes volúmenes de eluato (1×2.5 mL y 2×2.5 mL). . . . .	101
8.4	Áreas obtenidas mediante el empleo de diferentes volúmenes de eluato (1-8 mL). . . . .	101
8.5	Optimización del volumen de muestra. . . . .	103
8.6	Cromatograma de una muestra de agua de mar enriquecida. . . . .	105
8.7	Comparación entre LLE y SPE. . . . .	107
8.8	Influencia de la temperatura sobre la abundancia de varios iones precursores del Diclofluanid. . . . .	112
8.9	Cromatograma obtenido mediante SPE-LC-MS/MS en modo MRM. . . . .	113
9.1	Cromatograma correspondiente a la muestra A12 de marzo de 2008. . . . .	118
9.2	Cromatograma correspondiente a la muestra C2 de mayo de 2007. . . . .	122
9.3	Cromatograma correspondiente a la muestra C6 de julio de 2007. . . . .	123
9.4	Cromatograma correspondiente a la muestra A7 de noviembre de 2008. . . . .	124
9.5	Comparación de valores promedios de Diurón por puertos. . . . .	126
9.6	Comparación de valores promedios de Diurón por estación en cada puerto. . . . .	128
9.7	Comparación de valores promedios de Irgarol 1051 por puertos. . . . .	130
9.8	Comparación de valores promedios de Irgarol 1051 por estación en cada puerto. . . . .	131
9.9	Relación (Diurón)/(Irgarol 1051) por puerto y mes. . . . .	133

9.10	Distribución de los datos de toxicidad de Diurón. . . . .	135
9.11	Distribución de los datos de toxicidad de Irgarol 1051. . . . .	136
9.12	Cálculo de la probabilidad de excedencia y curva de probabilidad acumulada para el Irgarol 1051. . . . .	143
10.1	Efecto de la composición del disolvente en la extracción asistida por microondas. . . . .	151
10.2	Influencia de la proporción de agua sobre la retención de los analitos mediante SPE. . . . .	153
10.3	Influencia de la la proporción de agua sobre la retención de los analitos mediante MAE-SPE. . . . .	153
10.4	Superficies de respuesta potencia-tiempo para los biocidas en estudio.	158
10.5	Cromatograma TIC obtenido a partir de la extracción de una muestra de sedimento enriquecida. . . . .	159
11.1	Cromatograma de diversos iones monitorizados en MRM correspondiente a la muestra D3 de Mayo de 2009. . . . .	162
11.2	Niveles de los diferentes biocidas determinados en muestras de sedimentos. . . . .	163

## *Acrónimos*

- ACE:** *Assessment of Antifouling Agents in Coastal Environments* (proyecto).
- AFS Convention:** *International Convention on the Control of Harmful Anti-fouling Systems on Ships.*
- ASTM:** *American Society of Testing Materials.*
- APCI:** *Atmospheric Pressure Chemical Ionization.*
- CAS:** *Chemical Abstract Service.*
- CI:** *Chemical Ionization.*
- CPDU:** 1-(3,4-diclorofenil)-3,1-dimetilurea
- DAD:** *Diode Array Detector.*
- DCA:** 3,4-dicloroanilina.
- DCPMU:** 1-(3,4-diclorofenil)-3-metilurea.
- DCPU:** 1-(3,4-diclorofenil)urea.
- DMSA:** N,N-dimetil-*N'*-fenil-sulfamida.
- EC50:** Concentración Efectiva Media.
- ECD:** *Electron Capture Detector.*
- EDR:** *Extended Dynamic Range.*
- EPA:** *U.S. Environmental Protection Agency.*
- ESI:** *Electrospray Ionization.*
- FTD:** *Flame Thermionic Detector.*

**GC:** *Gas Chromatography.*

**GCB:** *Grafitized Carbon Black.*

**HPLC:** *High Performance Liquid Chromatography..*

**HQ:** *Hazard Quotient.*

**IC50:** *Concentración Inhibitoria Media.*

**IE:** *Electron Impact.*

**IMO:** *International Maritime Organization.*

**ISO:** *International Standard Organization.*

**IT:** *Ion Trap.*

**IUPAC:** *International Union of Pure and Applied Chemistry.*

**JPC:** *Joint Probability Curve.*

**LC50:** *Concentración Letal Media.*

**LLE:** *Liquid-Liquid Extraction.*

**LOD:** *Limit of Detection.*

**LOQ:** *Limit of Quantification.*

**MAE:** *Microwave Assisted Extraction.*

**MBT:** *2-mercaptobenzotiazol.*

**MPC:** *Maximum Permissible Concentration.*

**MPEC:** *Marine Protection Environmental Commission.*

**MRM:** *Multiple Reaction Monitoring.*

**MS:** *Mass Spectrometry.*

**MTBT:** *2-(metiltio)-benzotiazol.*

**NOEC:** *Niveles de Efectos No Observados.*

**ONU:** *Organización de Naciones Unidas.*

**PRA:** *Probabilistic Risk Assessment.*

**PVC:** Policloruro de Vinilo.

**SFE:** *Supercritical Fluid Extraction.*

**SIM:** *Selected Ion Monitoring.*

**SME:** *Solvent Microextraction.*

**SPE:** *Solid Phase Extraction.*

**SPME:** *Solid Phase Microextraction.*

**TBT:** *Tributyltin.*

**TCMTB:** *2-(thiocyanomethylthio)benzothiazole.*

**TEU:** *Twenty-foot Equivalent Unit.*

**TIC:** *Total Ion Current.*

**TPBT:** *Triphenylborane-pyridine.*

**TPT:** *Triphenyltin.*

**TRV:** *Toxicant Reference Value.*

# *ANEXOS*

---

# Anexo A

## Niveles de biocidas en muestras de agua de mar y sedimentos

**Tabla A.1** .- Niveles de Diurón e Irgarol 1051 determinados en muestras de agua de mar mediante SPE-HPLC-DAD (media  $\pm$  desviación estándar de dos determinaciones).

<i>Muestra</i>	<i>Mes</i>	<i>Diurón (ng/L)</i>	<i>Irgarol 1051 (ng/L)</i>
A10	Mayo 2007	45.2 $\pm$ 3.1 <sup>a</sup>	< LOD <sup>b</sup>
B1	Mayo 2007	49.0 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	< LOD <sup>b</sup>
B2	Mayo 2007	49.5 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	< LOD <sup>b</sup>
B3	Mayo 2007	69.2 $\pm$ 0.7	< LOD <sup>b</sup>
B4	Mayo 2007	96.7 $\pm$ 3.1	< LOD <sup>b</sup>
C1	Mayo 2007	44.7 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	33.1 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>
C2	Mayo 2007	78.3 $\pm$ 0.9	35.0 $\pm$ 3.2 <sup>a</sup>
C3	Mayo 2007	< LOD <sup>b</sup>	46.1 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Concentración entre el límite de detección y el intervalo de linealidad establecido.

<sup>b</sup>Concentración inferior al límite de detección.

---

Continuación

<i>Muestra</i>	<i>Mes</i>	<i>Diurón (ng/L)</i>	<i>Irgarol 1051 (ng/L)</i>
C4	Mayo 2007	43.8 ± 2.9 <sup>a</sup>	< LOD <sup>b</sup>
C5	Mayo 2007	60.4 ± 1.0	< LOD <sup>b</sup>
D1	Mayo 2007	71.1 ± 0.3	< LOD <sup>b</sup>
D2	Mayo 2007	100.1 ± 3.5	< LOD <sup>b</sup>
A2	Julio 2007	40.3 ± 1.2 <sup>a</sup>	< LOD <sup>b</sup>
A11	Julio 2007	69.6 ± 0.4	< LOD <sup>b</sup>
A12	Julio 2007	61.7 ± 0.2	< LOD <sup>b</sup>
A13	Julio 2007	65.5 ± 3.4	< LOD <sup>b</sup>
A14	Julio 2007	49.1 ± 3.1 <sup>a</sup>	< LOD <sup>b</sup>
B3	Julio 2007	61.0 ± 1.8	< LOD <sup>b</sup>
B4	Julio 2007	47.8 ± 1.7 <sup>a</sup>	< LOD <sup>b</sup>
C2	Julio 2007	50.6 ± 1.2	< LOD <sup>b</sup>
C3	Julio 2007	< LOD <sup>b</sup>	36.6 ± 1.0 <sup>a</sup>
C4	Julio 2007	61.0 ± 1.0	31.7 ± 4.2 <sup>a</sup>
C5	Julio 2007	207.3 ± 2.6	< LOD <sup>b</sup>
C6	Julio 2007	44.5 ± 0.7 <sup>a</sup>	< LOD <sup>b</sup>
D2	Julio 2007	50.5 ± 0.3	< LOD <sup>b</sup>
A1	Septiembre 2007	52.8 ± 2.7	< LOD <sup>b</sup>
A2	Septiembre 2007	59.2 ± 2.7	< LOD <sup>b</sup>
A6	Septiembre 2007	66.5 ± 4.6	< LOD <sup>b</sup>
A7	Septiembre 2007	384.6 ± 17.4	< LOD <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Concentración entre el límite de detección y el intervalo de linealidad establecido.

<sup>b</sup>Concentración inferior al límite de detección.



## A. Niveles de biocidas en muestras de agua de mar y sedimentos

Continuación			
<i>Muestra</i>	<i>Mes</i>	<i>Diurón (ng/L)</i>	<i>Irgarol 1051 (ng/L)</i>
A8	Septiembre 2007	54.0 ± 1.7	< LOD <sup>b</sup>
A9	Septiembre 2007	37.7 ± 1.2 <sup>a</sup>	< LOD <sup>b</sup>
A12	Septiembre 2007	43.5 ± 0.6 <sup>a</sup>	< LOD <sup>b</sup>
A14	Septiembre 2007	42.2 ± 2.8 <sup>a</sup>	< LOD <sup>b</sup>
C2	Septiembre 2007	63.6 ± 0.3	< LOD <sup>b</sup>
C3	Septiembre 2007	40.7 ± 0.2 <sup>a</sup>	48.8 ± 4.8 <sup>a</sup>
C4	Septiembre 2007	69.8 ± 1.9	37.3 ± 0.1 <sup>a</sup>
C5	Septiembre 2007	64.9 ± 3.8	< LOD <sup>b</sup>
C6	Septiembre 2007	42.2 ± 1.4 <sup>a</sup>	< LOD <sup>b</sup>
D2	Septiembre 2007	50.7 ± 1.2	< LOD <sup>b</sup>
A1	Noviembre 2007	59.3 ± 6.6	< LOD <sup>b</sup>
A2	Noviembre 2007	191.4 ± 10.3	< LOD <sup>b</sup>
A5	Noviembre 2007	40.3 ± 0.3 <sup>a</sup>	< LOD <sup>b</sup>
A6	Noviembre 2007	91.9 ± 4.7	< LOD <sup>b</sup>
A7	Noviembre 2007	165.5 ± 0.1	< LOD <sup>b</sup>
A8	Noviembre 2007	103.3 ± 7.9	< LOD <sup>b</sup>
A9	Noviembre 2007	97.7 ± 5.8	< LOD <sup>b</sup>
A10	Noviembre 2007	46.6 ± 1.3 <sup>a</sup>	< LOD <sup>b</sup>
A11	Noviembre 2007	59.6 ± 1.3	< LOD <sup>b</sup>
A12	Noviembre 2007	74.2 ± 1.0	< LOD <sup>b</sup>
A13	Noviembre 2007	44.2 ± 2.4 <sup>a</sup>	53.4 ± 2.2

<sup>a</sup>Concentración entre el límite de detección y el intervalo de linealidad establecido.

<sup>b</sup>Concentración inferior al límite de detección.

---

Continuación

<i>Muestra</i>	<i>Mes</i>	<i>Diurón (ng/L)</i>	<i>Irgarol 1051 (ng/L)</i>
C2	Noviembre 2007	38.3 ± 2.8 <sup>a</sup>	< LOD <sup>b</sup>
C4	Noviembre 2007	41.8 ± 1.6 <sup>a</sup>	< LOD <sup>b</sup>
D1	Noviembre 2007	61.0 ± 0.6	< LOD <sup>b</sup>
D2	Noviembre 2007	51.2 ± 0.8	< LOD <sup>b</sup>
A1	Enero 2008	79.3 ± 4.6	< LOD <sup>b</sup>
A2	Enero 2008	54.7 ± 0.7	< LOD <sup>b</sup>
A3	Enero 2008	58.8 ± 1.7	< LOD <sup>b</sup>
A4	Enero 2008	59.1 ± 3.5	< LOD <sup>b</sup>
A5	Enero 2008	51.3 ± 2.3	< LOD <sup>b</sup>
A6	Enero 2008	99.4 ± 10.4	< LOD <sup>b</sup>
A7	Enero 2008	94.3 ± 3.2	< LOD <sup>b</sup>
A8	Enero 2008	100.6 ± 0.1	< LOD <sup>b</sup>
A9	Enero 2008	87.9 ± 4.2	< LOD <sup>b</sup>
A10	Enero 2008	69.8 ± 2.7	< LOD <sup>b</sup>
A11	Enero 2008	69.4 ± 3.3	< LOD <sup>b</sup>
A12	Enero 2008	52.7 ± 1.0	< LOD <sup>b</sup>
A13	Enero 2008	47.7 ± 0.2 <sup>a</sup>	< LOD <sup>b</sup>
A14	Enero 2008	55.3 ± 0.8	< LOD <sup>b</sup>
B1	Enero 2008	48.2 ± 1.7	< LOD <sup>b</sup>
B2	Enero 2008	44.1 ± 1.5 <sup>a</sup>	< LOD <sup>b</sup>
B3	Enero 2008	49.3 ± 7.7 <sup>a</sup>	< LOD <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Concentración entre el límite de detección y el intervalo de linealidad establecido.

<sup>b</sup>Concentración inferior al límite de detección.

## A. Niveles de biocidas en muestras de agua de mar y sedimentos

Continuación			
<i>Muestra</i>	<i>Mes</i>	<i>Diurón (ng/L)</i>	<i>Irgarol 1051 (ng/L)</i>
B4	Enero 2008	46.3 ± 1.2 <sup>a</sup>	< LOD <sup>b</sup>
D1	Enero 2008	86.9 ± 1.5	56.8 ± 0.2
D2	Enero 2008	53.1 ± 0.7	< LOD <sup>b</sup>
A6	Marzo 2008	55.7 ± 3.6	< LOD <sup>b</sup>
A7	Marzo 2008	94.3 ± 0.3	< LOD <sup>b</sup>
A10	Marzo 2008	124.7 ± 12.8	< LOD <sup>b</sup>
A11	Marzo 2008	337.2 ± 15.6	< LOD <sup>b</sup>
A12	Marzo 2008	635.2 ± 34.5	< LOD <sup>b</sup>
A13	Marzo 2008	107.6 ± 1.3	< LOD <sup>b</sup>
A14	Marzo 2008	155.0 ± 1.0	< LOD <sup>b</sup>
B3	Marzo 2008	40.2 ± 3.6 <sup>a</sup>	< LOD <sup>b</sup>
B4	Marzo 2008	39.3 ± 4.7 <sup>a</sup>	< LOD <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Concentración entre el límite de detección y el intervalo de linealidad establecido.

<sup>b</sup>Concentración inferior al límite de detección.

**Tabla A.2 .-** Niveles de Diurón e Irgarol 1051 determinados en muestras de agua de mar mediante SPE-LC-MS/MS. Medida  $\pm$  desviación estándar de dos determinaciones.

<i>Muestra</i>	<i>Mes</i>	<i>Diurón (ng/L)</i>	<i>Irgarol 1051 (ng/L)</i>
A1	Mayo 2008	22.2 $\pm$ 0.8	2.4 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>
A2	Mayo 2008	7.4 $\pm$ 1.3	2.7 $\pm$ 0.6
A3	Mayo 2008	7.0 $\pm$ 0.4	2.4 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>
A4	Mayo 2008	6.1 $\pm$ 1.1	5.9 $\pm$ 0.2
A5	Mayo 2008	3.6 $\pm$ 0.8	2.7 $\pm$ 0.1
A6	Mayo 2008	17.6 $\pm$ 0.9	7.9 $\pm$ 0.1
A7	Mayo 2008	41.0 $\pm$ 2.0	10.2 $\pm$ 0.2
A8	Mayo 2008	24.6 $\pm$ 0.8	10.1 $\pm$ 0.3
A9	Mayo 2008	39.6 $\pm$ 5.4	12.4 $\pm$ 1.4
A10	Mayo 2008	64.9 $\pm$ 0.1	40.2 $\pm$ 0.8
A11	Mayo 2008	68.3 $\pm$ 11.1	27.7 $\pm$ 2.1
A12	Mayo 2008	70.7 $\pm$ 0.1	27.7 $\pm$ 2.1
A13	Mayo 2008	52.6 $\pm$ 0.1	24.8 $\pm$ 1.3
A14	Mayo 2008	113.0 $\pm$ 0.3	50.7 $\pm$ 3.3
B1	Mayo 2008	4.5 $\pm$ 0.8	40.9 $\pm$ 4.5
B2	Mayo 2008	4.7 $\pm$ 1.2	31.1 $\pm$ 3.8
B3	Mayo 2008	9.2 $\pm$ 2.2	8.2 $\pm$ 0.1
B4	Mayo 2008	7.8 $\pm$ 1.7	16.0 $\pm$ 1.0
C1	Mayo 2008	37.1 $\pm$ 0.1	48.0 $\pm$ 0.1

<sup>a</sup>Concentración entre el límite de detección y el intervalo de linealidad establecido.

<sup>b</sup>Concentración inferior al límite de detección.

## A. Niveles de biocidas en muestras de agua de mar y sedimentos

Continuación			
<i>Muestra</i>	<i>Mes</i>	<i>Diurón</i> (ng/L)	<i>Irgarol 1051</i> (ng/L)
C2	Mayo 2008	18.9 ± 2.5	20.5 ± 2.9
C3	Mayo 2008	9.9 ± 2.2	14.8 ± 3.3
C4	Mayo 2008	22.1 ± 1.2	145.9 ± 4.2
C5	Mayo 2008	33.2 ± 1.8	122.3 ± 3.3
C6	Mayo 2008	5.1 ± 0.0	46.1 ± 5.1
D1	Mayo 2008	23.0 ± 3.7	11.8 ± 2.3
D2	Mayo 2008	< LOD <sup>b</sup>	6.3 ± 1.4
A1	Julio 2008	18.1 ± 0.7	6.4 ± 0.4
A2	Julio 2008	44.2 ± 0.5	3.2 ± 1.5
A3	Julio 2008	55.2 ± 1.1	5.7 ± 0.1
A4	Julio 2008	43.5 ± 1.9	5.6 ± 0.2
A5	Julio 2008	23.3 ± 0.7	5.3 ± 0.2
A6	Julio 2008	14.7 ± 2.4	4.5 ± 0.7
A7	Julio 2008	46.6 ± 1.7	9.9 ± 0.5
A8	Julio 2008	22.7 ± 0.3	8.2 ± 0.1
A9	Julio 2008	19.7 ± 1.2	4.4 ± 1.3
A10	Julio 2008	27.5 ± 3.0	7.3 ± 1.4
A11	Julio 2008	55.2 ± 3.8	17.1 ± 0.7
A12	Julio 2008	111.2 ± 3.1	28.1 ± 0.2
A13	Julio 2008	62.9 ± 1.6	29.3 ± 0.4
A14	Julio 2008	60.2 ± 1.7	17.0 ± 4.1

<sup>a</sup>Concentración entre el límite de detección y el intervalo de linealidad establecido.

<sup>b</sup>Concentración inferior al límite de detección.

---

Continuación

<i>Muestra</i>	<i>Mes</i>	<i>Diurón (ng/L)</i>	<i>Irgarol 1051 (ng/L)</i>
B1	Julio 2008	17.5 ± 1.4	25.9 ± 0.7
B2	Julio 2008	12.0 ± 0.1	45.7 ± 1.0
B3	Julio 2008	93.1 ± 1.4	134.6 ± 0.4
B4	Julio 2008	34.6 ± 0.7	63.0 ± 0.4
C1	Julio 2008	11.1 ± 1.3	146.5 ± 0.1
C2	Julio 2008	24.4 ± 0.9	86.1 ± 3.9
C3	Julio 2008	2.3 ± 0.3 <sup>a</sup>	15.2 ± 0.8
C4	Julio 2008	21.8 ± 2.1	50.0 ± 2.0
C5	Julio 2008	14.6 ± 0.4	49.9 ± 3.3
C6	Julio 2008	5.7 ± 0.1	21.7 ± 2.4
D1	Julio 2008	34.5 ± 2.4	11.6 ± 0.4
D2	Julio 2008	9.6 ± 0.7	3.3 ± 0.1
A1	Septiembre 2008	19.1 ± 0.4	3.8 ± 0.4
A2	Septiembre 2008	8.4 ± 1.3	4.9 ± 0.3
A3	Septiembre 2008	16.8 ± 3.2	5.7 ± 0.2
A4	Septiembre 2008	15.3 ± 0.1	9.5 ± 0.7
A5	Septiembre 2008	8.9 ± 1.0	6.4 ± 0.4
A6	Septiembre 2008	57.3 ± 2.2	18.4 ± 1.3
A7	Septiembre 2008	155.2 ± 6.4	46.7 ± 0.9
A8	Septiembre 2008	50.1 ± 0.8	20.8 ± 0.5
A9	Septiembre 2008	26.8 ± 2.3	14.6 ± 1.2

<sup>a</sup>Concentración entre el límite de detección y el intervalo de linealidad establecido.

<sup>b</sup>Concentración inferior al límite de detección.

## A. Niveles de biocidas en muestras de agua de mar y sedimentos

Continuación			
<i>Muestra</i>	<i>Mes</i>	<i>Diurón (ng/L)</i>	<i>Irgarol 1051 (ng/L)</i>
A10	Septiembre 2008	86.9 ± 8.3	22.1 ± 1.4
A11	Septiembre 2008	195.0 ± 27.6	37.5 ± 4.9
A12	Septiembre 2008	52.0 ± 2.5	12.5 ± 0.1
A13	Septiembre 2008	97.0 ± 7.1	23.0 ± 0.5
A14	Septiembre 2008	155.9 ± 4.2	34.6 ± 4.5
B1	Septiembre 2008	11.7 ± 0.1	11.7 ± 0.9
B2	Septiembre 2008	13.7 ± 1.1	22.4 ± 0.3
B3	Septiembre 2008	33.8 ± 2.3	28.4 ± 3.3
B4	Septiembre 2008	34.4 ± 3.3	52.5 ± 1.8
C1	Septiembre 2008	16.1 ± 1.0	48.3 ± 2.6
C2	Septiembre 2008	32.0 ± 0.6	24.0 ± 1.6
C3	Septiembre 2008	24.1 ± 0.5	27.0 ± 0.2
C4	Septiembre 2008	13.7 ± 1.4	29.3 ± 0.1
C5	Septiembre 2008	34.7 ± 6.1	89.3 ± 7.0
C6	Septiembre 2008	23.4 ± 0.2	74.7 ± 0.6
D1	Septiembre 2008	59.4 ± 0.1	16.9 ± 0.6
D2	Septiembre 2008	11.7 ± 0.1	7.1 ± 0.2
A1	Noviembre 2008	28.4 ± 4.1	10.1 ± 0.9
A2	Noviembre 2008	19.6 ± 1.2	19.4 ± 0.2
A3	Noviembre 2008	24.4 ± 1.1	51.6 ± 0.3
A4	Noviembre 2008	20.3 ± 0.1	43.6 ± 3.4

<sup>a</sup>Concentración entre el límite de detección y el intervalo de linealidad establecido.

<sup>b</sup>Concentración inferior al límite de detección.

---

Continuación

<i>Muestra</i>	<i>Mes</i>	<i>Diurón (ng/L)</i>	<i>Irgarol 1051 (ng/L)</i>
A5	Noviembre 2008	23.1 ± 0.1	21.6 ± 0.8
A6	Noviembre 2008	40.0 ± 2.7	50.7 ± 2.1
A7	Noviembre 2008	47.5 ± 2.4	72.1 ± 3.7
A8	Noviembre 2008	43.4 ± 1.6	61.1 ± 1.5
A9	Noviembre 2008	44.0 ± 2.5	46.9 ± 2.1
A10	Noviembre 2008	46.2 ± 0.3	20.3 ± 0.9
A11	Noviembre 2008	50.8 ± 0.3	22.6 ± 0.1
A12	Noviembre 2008	28.6 ± 2.7	13.6 ± 0.4
A13	Noviembre 2008	20.6 ± 0.1	12.4 ± 0.2
A14	Noviembre 2008	80.8 ± 2.5	50.5 ± 1.0
B1	Noviembre 2008	10.0 ± 0.7	8.2 ± 0.3
B2	Noviembre 2008	20.2 ± 1.2	12.3 ± 1.3
B3	Noviembre 2008	25.0 ± 0.3	17.7 ± 0.3
B4	Noviembre 2008	12.7 ± 1.9	17.8 ± 0.5
C1	Noviembre 2008	11.8 ± 0.7	54.3 ± 0.8
C2	Noviembre 2008	15.3 ± 0.4	33.5 ± 7.6
C3	Noviembre 2008	7.7 ± 1.2	23.3 ± 0.4
C4	Noviembre 2008	2.4 ± 0.2 <sup>a</sup>	10.0 ± 0.7
C5	Noviembre 2008	5.7 ± 0.5	27.6 ± 0.8
C6	Noviembre 2008	3.5 ± 0.8	16.0 ± 0.1
D1	Noviembre 2008	31.2 ± 1.3	19.7 ± 1.1

<sup>a</sup>Concentración entre el límite de detección y el intervalo de linealidad establecido.

<sup>b</sup>Concentración inferior al límite de detección.



## A. Niveles de biocidas en muestras de agua de mar y sedimentos

Continuación			
<i>Muestra</i>	<i>Mes</i>	<i>Diurón (ng/L)</i>	<i>Irgarol 1051 (ng/L)</i>
D2	Noviembre 2008	22.1 ± 0.4	18.8 ± 0.7
A1	Enero 2009	15.4 ± 3.0	10.7 ± 1.9
A2	Enero 2009	26.9 ± 3.0	24.7 ± 0.1
A3	Enero 2009	38.4 ± 0.7	43.3 ± 1.1
A4	Enero 2009	26.1 ± 1.2	44.7 ± 1.3
A5	Enero 2009	21.3 ± 3.5	14.4 ± 2.1
A6	Enero 2009	28.0 ± 0.3	31.9 ± 0.5
A7	Enero 2009	104.2 ± 2.4	28.8 ± 1.1
A8	Enero 2009	42.9 ± 5.9	40.8 ± 6.9
A9	Enero 2009	48.3 ± 2.6	35.6 ± 3.3
A10	Enero 2009	31.4 ± 1.5	17.0 ± 0.3
A11	Enero 2009	59.3 ± 2.7	19.2 ± 1.4
A12	Enero 2009	29.1 ± 1.4	12.3 ± 0.8
A13	Enero 2009	20.0 ± 1.1	13.1 ± 1.3
A14	Enero 2009	56.9 ± 1.9	18.8 ± 1.0
B1	Enero 2009	25.5 ± 1.6	11.1 ± 0.2
B2	Enero 2009	32.7 ± 1.4	19.4 ± 1.1
B3	Enero 2009	42.1 ± 1.7	29.1 ± 1.0
B4	Enero 2009	55.8 ± 2.8	32.4 ± 2.2
C1	Enero 2009	10.0 ± 0.9	21.5 ± 1.6
C2	Enero 2009	28.5 ± 0.5	20.5 ± 0.9

<sup>a</sup>Concentración entre el límite de detección y el intervalo de linealidad establecido.

<sup>b</sup>Concentración inferior al límite de detección.

---

Continuación

<i>Muestra</i>	<i>Mes</i>	<i>Diurón (ng/L)</i>	<i>Irgarol 1051 (ng/L)</i>
C3	Enero 2009	5.0 ± 0.5	6.7 ± 1.6
C4	Enero 2009	2.6 ± 0.3	7.6 ± 0.3
C5	Enero 2009	5.9 ± 0.3	13.9 ± 0.2
C6	Enero 2009	19.6 ± 0.1	12.1 ± 0.2
D1	Enero 2009	19.8 ± 0.6	16.8 ± 1.3
D2	Enero 2009	16.2 ± 0.4	15.2 ± 0.3
A1	Marzo 2009	12.8 ± 1.3	7.6 ± 1.5
A2	Marzo 2009	8.6 ± 0.1	14.1 ± 0.4
A3	Marzo 2009	11.4 ± 2.2	26.0 ± 1.4
A4	Marzo 2009	28.1 ± 1.8	27.8 ± 2.2
A5	Marzo 2009	26.9 ± 0.8	7.4 ± 1.3
A6	Marzo 2009	47.7 ± 1.6	14.4 ± 0.2
A7	Marzo 2009	121.2 ± 2.0	14.3 ± 1.1
A8	Marzo 2009	54.5 ± 5.6	16.3 ± 0.7
A9	Marzo 2009	58.6 ± 5.6	15.8 ± 0.6
A10	Marzo 2009	64.8 ± 6.5	15.9 ± 0.9
A11	Marzo 2009	69.1 ± 1.3	16.5 ± 0.6
A12	Marzo 2009	54.1 ± 1.7	10.2 ± 0.2
A13	Marzo 2009	33.1 ± 1.0	14.6 ± 0.1
A14	Marzo 2009	99.3 ± 0.8	24.1 ± 1.3
B1	Marzo 2009	17.9 ± 1.0	23.8 ± 1.9

<sup>a</sup>Concentración entre el límite de detección y el intervalo de linealidad establecido.

<sup>b</sup>Concentración inferior al límite de detección.

## A. Niveles de biocidas en muestras de agua de mar y sedimentos

Continuación			
<i>Muestra</i>	<i>Mes</i>	<i>Diurón (ng/L)</i>	<i>Irgarol 1051 (ng/L)</i>
B2	Marzo 2009	14.6 ± 0.1	27.7 ± 0.5
B3	Marzo 2009	32.4 ± 0.3	50.8 ± 3.1
B4	Marzo 2009	27.1 ± 1.0	46.6 ± 2.4
C1	Marzo 2009	5.5 ± 0.9	14.4 ± 1.5
C2	Marzo 2009	15.6 ± 0.7	19.5 ± 0.5
C3	Marzo 2009	4.8 ± 0.1	10.6 ± 0.7
C4	Marzo 2009	6.6 ± 1.4	3.0 ± 0.1
C5	Marzo 2009	72.1 ± 0.6	14.1 ± 0.2
C6	Marzo 2009	203.7 ± 11.0	12.9 ± 0.5
D1	Marzo 2009	14.4 ± 0.9	9.7 ± 0.6
D2	Marzo 2009	8.1 ± 1.1	6.0 ± 0.1
A1	Mayo 2009	25.4 ± 0.5	3.3 ± 0.2
A2	Mayo 2009	11.8 ± 0.9	9.5 ± 0.2
A3	Mayo 2009	11.5 ± 0.9	12.8 ± 0.2
A4	Mayo 2009	10.9 ± 1.8	33.1 ± 1.4
A5	Mayo 2009	6.5 ± 0.8	3.4 ± 0.4
A6	Mayo 2009	30.6 ± 3.1	11.9 ± 0.4
A7	Mayo 2009	36.5 ± 1.5	12.6 ± 1.4
A8	Mayo 2009	40.7 ± 2.3	17.1 ± 1.1
A9	Mayo 2009	44.9 ± 3.5	15.5 ± 1.1
A10	Mayo 2009	49.0 ± 0.2	15.8 ± 0.1

<sup>a</sup>Concentración entre el límite de detección y el intervalo de linealidad establecido.

<sup>b</sup>Concentración inferior al límite de detección.

---

Continuación			
<i>Muestra</i>	<i>Mes</i>	<i>Diurón (ng/L)</i>	<i>Irgarol 1051 (ng/L)</i>
A11	Mayo 2009	78.2 ± 7.6	22.6 ± 1.3
A12	Mayo 2009	95.4 ± 7.5	26.7 ± 0.2
A13	Mayo 2009	80.0 ± 2.9	43.6 ± 0.5
A14	Mayo 2009	80.6 ± 2.1	28.6 ± 1.0
B1	Mayo 2009	7.6 ± 0.1	9.6 ± 1.2
B2	Mayo 2009	7.4 ± 0.6	19.6 ± 1.1
B3	Mayo 2009	18.9 ± 0.2	42.6 ± 1.7
B4	Mayo 2009	10.3 ± 0.3	15.7 ± 0.2
C1	Mayo 2009	8.9 ± 0.3	49.2 ± 1.8
C2	Mayo 2009	18.6 ± 0.3	22.8 ± 0.5
C3	Mayo 2009	3.7 ± 0.3	10.3 ± 0.7
C4	Mayo 2009	8.4 ± 1.0	6.8 ± 0.2
C5	Mayo 2009	32.0 ± 5.3	16.7 ± 1.3
C6	Mayo 2009	41.5 ± 3.6	17.0 ± 1.2
D1	Mayo 2009	13.0 ± 0.2	13.8 ± 0.4
D2	Mayo 2009	16.4 ± 0.4	7.5 ± 0.3

---

<sup>a</sup>Concentración entre el límite de detección y el intervalo de linealidad establecido.

<sup>b</sup>Concentración inferior al límite de detección.

## A. Niveles de biocidas en muestras de agua de mar y sedimentos

**Tabla A.3** .- Niveles de Diurón, Irgarol 1051 y Diclofluanid determinados en muestras de sedimentos mediante MAE-SPE-LC-MS/MS (media  $\pm$  desviación estándar de dos determinaciones).

<i>Muestra</i>	<i>Mes</i>	<i>Diurón</i> (ng/g)	<i>Irgarol 1051</i> (ng/g)	<i>Diclofluanid</i> (ng/g)
A7	Enero 2008	< LOD <sup>a</sup>	1.4 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	< LOD <sup>a</sup>
A8	Enero 2008	< LOD <sup>a</sup>	9.5 $\pm$ 8.5	< LOD <sup>a</sup>
A11	Enero 2008	1.6 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	2.8 $\pm$ 0.7	3.5 $\pm$ 0.2
C4	Enero 2008	< LOD <sup>a</sup>	2.4 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	2.7 $\pm$ 0.1
D3	Enero 2008	19.0 <sup>c</sup>	19.1 $\pm$ 5.0	3.7 $\pm$ 0.6
A11	Marzo 2008	1.4 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	2.4 $\pm$ 2.0 <sup>b</sup>	3.5 $\pm$ 0.3
C4	Marzo 2008	< LOD <sup>a</sup>	1.2 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>	< LOD <sup>a</sup>
D3	Marzo 2008	2.9 $\pm$ 0.3	13.1 $\pm$ 0.8	5.1 $\pm$ 1.3
A11	Mayo 2008	1.5 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	2.3 $\pm$ 0.9 <sup>b</sup>	3.7 $\pm$ 0.1
C4	Mayo 2008	< LOD <sup>a</sup>	2.2 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>	2.1 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>
D3	Mayo 2008	5.2 $\pm$ 1.0	26.4 <sup>c</sup>	4.5 $\pm$ 1.2
A11	Julio 2008	6.4 $\pm$ 2.2	5.0 $\pm$ 4.3	2.7 $\pm$ 0.3
C4	Julio 2008	< LOD <sup>a</sup>	0.7 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	< LOD <sup>a</sup>
D3	Julio 2008	4.5 $\pm$ 1.0	15.0 $\pm$ 2.2	8.0 $\pm$ 3.3
A11	Septiembre 2008	1.3 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	< LOD <sup>a</sup>	2.2 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>
D3	Septiembre 2008	3.7 $\pm$ 0.2	22.0 $\pm$ 1.9	8.6 $\pm$ 1.6
A11	Noviembre 2008	2.4 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	< LOD <sup>a</sup>	6.0 $\pm$ 1.9

<sup>a</sup>Concentración inferior al límite de detección.

<sup>b</sup>Concentración entre el límite de detección y el intervalo de linealidad establecido.

<sup>c</sup>Valor obtenido de una determinación.

---



---

Continuación				
<i>Muestra</i>	<i>Mes</i>	<i>Diurón</i> (ng/g)	<i>Irgarol 1051</i> (ng/g)	<i>Diclofluanid</i> (ng/g)
C4	Noviembre 2008	1.8 ± 1.2 <sup>b</sup>	2.7 ± 1.6	< LOD <sup>a</sup>
D3	Noviembre 2008	2.6 ± 0.1	13.9 ± 5.5	3.1 ± 0.1
A11	Enero 2009	1.2 ± 1.2 <sup>b</sup>	< LOD <sup>a</sup>	2.3 ± 0.4 <sup>b</sup>
C4	Enero 2009	< LOD <sup>a</sup>	3.3 ± 2.7	3.1 ± 1.8
D3	Enero 2009	3.9 ± 0.1	26.4 ± 6.7	5.6 ± 1.4
A8	Marzo 2009	21.3 <sup>c</sup>	< LOD <sup>a</sup>	< LOD <sup>a</sup>
A11	Marzo 2009	1.0 ± 0.1 <sup>b</sup>	1.3 ± 0.8 <sup>b</sup>	2.2 ± 0.4 <sup>b</sup>
C4	Marzo 2009	< LOD <sup>a</sup>	3.4 ± 3.5	3.3 ± 1.5
A11	Mayo 2009	< LOD <sup>a</sup>	0.7 ± 0.4 <sup>b</sup>	3.8 ± 0.3
C4	Mayo 2009	1.0 ± 0.2 <sup>b</sup>	< LOD <sup>a</sup>	3.7 ± 0.8
D3	Mayo 2009	5.3 ± 0.8	23.9 ± 4.0	16.6 ± 0.8

---

<sup>a</sup>Concentración inferior al límite de detección.

<sup>b</sup>Concentración entre el límite de detección y intervalo de linealidad establecido.

<sup>c</sup>Valor obtenido de una determinación.

# Anexo B

## *Difusión científica*

El trabajo desarrollado en la presente Tesis Doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones y comunicaciones a congresos:

### **B.1. Publicaciones**

- ◇ **Título:** *A preliminary assessment of levels of antifouling booster biocides in harbours and marinas of the island of Gran Canaria, using SPE-HPLC.*

**Autores:** Á. S. Rodríguez, Z. S. Ferrera, J. J. S. Rodríguez.

**Revista:** Environmental Chemistry Letters.

**DOI:** 10.1007/s10311-009-0265-3.

- ◇ **Título:** *An evaluation of antifouling booster biocides in Gran Canaria coastal waters using SPE-LC MS/MS.*

**Autores:** Á. S. Rodríguez, Z. S. Ferrera, J. J. S. Rodríguez.

**Revista:** International Journal of Environmental Analytical Chemistry.

**DOI:**10.1080/03067310903524848 (en prensa).

## B.2. Comunicaciones a congresos

⇒ **Título:** *Optimization of a method for determination of antifouling paint booster biocides in marine water samples.*

**Autores:** Á. S. Rodríguez, Z. S. Ferrera, J. J. S. Rodríguez.

**Congreso:** International Symposium in Marine Sciences 2007 (ISMS 2007).

**Lugar de celebración:** Valencia (España). **Fecha:** Marzo 2007.

⇒ **Título:** *An approach of the levels of contamination by the presence of antifouling booster biocides in marine water samples coming from ports and marinas of Gran Canaria island*

**Autores:** Á. S. Rodríguez, Z. S. Ferrera, J. J. S. Rodríguez.

**Congreso:** IX Internacional Symposium on Analytical Methodology in Environmental Field.

**Lugar de celebración:** Mallorca (España). **Fecha:** Octubre 2007.

⇒ **Título:** *Evaluation of principal booster biocides in water samples coming from Gran Canaria island by SPE-HPLC with UV detection.*

**Autores:** Á. S. Rodríguez, Z. S. Ferrera, J. J. S. Rodríguez.

**Congreso:** XXI Reunión Nacional de Espectroscopia V Congreso Ibérico de Espectroscopía.

**Lugar de celebración:** Murcia (España). **Fecha:** Septiembre 2008.



## B. Difusión científica

---

- ◇ **Título:** *Determination of Irgarol 1051 and Diuron in marine water samples coming from Gran Canaria island by solid phase extraction and LC-ESI-MS.*  
**Autores:** Á. S. Rodríguez, Z. S. Ferrera, J. J. S. Rodríguez.  
**Congreso:** XXII Jornadas De Análisis Instrumental.  
**Lugar de celebración:** Barcelona (España). **Fecha:** Octubre 2008.
  
- ◇ **Título:** *Assessment of the presence of booster biocides in marine water samples coming from Gran Canaria island.*  
**Autores:** Á. S. Rodríguez, Z. S. Ferrera, J. J. S. Rodríguez.  
**Congreso:** International Symposium in Marine Sciences 2009 (ISMS 2009).  
**Lugar de celebración:** Vigo (España). **Fecha:** Abril 2009.
  
- ◇ **Título:** *Combination of SPE and LC-MS/MS for monitoring of selected booster biocides in coastal waters of Gran Canaria island.*  
**Autores:** Á. S. Rodríguez, Z. S. Ferrera, J. J. S. Rodríguez.  
**Congreso:** HPLC 2009.  
**Lugar de celebración:** Dresden (Alemania). **Fecha:** Junio 2009.
  
- ◇ **Título:** *Optimization of a simple method for the determination of common booster biocides in marine sediments by means of MAE and LC-MS/MS.*  
**Autores:** Á. S. Rodríguez, Z. S. Ferrera, J. J. S. Rodríguez.  
**Congreso:** Euroanalysis 2009.  
**Lugar de celebración:** Innsbruck (Austria). **Fecha:** Septiembre 2009.



## A preliminary assessment of levels of antifouling booster biocides in harbours and marinas of the island of Gran Canaria, using SPE-HPLC

Álvaro Sánchez Rodríguez · Zoraida Sosa Ferrera · José Juan Santana Rodríguez

Received: 11 June 2008 / Accepted: 7 December 2009  
© Springer-Verlag 2009

**Abstract** An analytical procedure was developed to allow for the study of the levels of concentration of biocides in the various different ports on the island of Gran Canaria, The Canary Islands. The analytes studied were extracted from water samples using solid-phase extraction and then determined by high-performance liquid chromatography using a diode array detector. The relative standard deviations of the developed procedure were under 12%. Recoveries over 85% and limits of detection between 0.007 and 0.4 µg/L were obtained for all the analytes. The method was applied to the analysis of sea water samples from the ports and marinas on the island of Gran Canaria.

**Keywords** Irgarol 1051 · Diuron · Chlorothalonil · Dichlofluaniid · TCMTB · Thiram · 4-Chloro-3-methylphenol

### Introduction

Antifouling paints were introduced to avoid biofouling. The term biofouling refers to the undesirable accumulation of microorganisms, plants and animals on artificial surfaces immersed in water. This accumulation causes several problems such as greater frictional resistance, deterioration of the coating, with the consequent economic loss (Yebrá et al. 2004).

In the 1970s, Tributyltin (TBT) was introduced in a ship painting industry, with excellent results. However, TBT is to be considered a persistent and toxic compound. It manifests extreme toxicity in non-target species, such as bivalves and gastropods, some of which are of commercial interest, and degrades slowly into the environment, with a half-life in sediments ranging between several months or even years (Hoch 2001). For this reason, the use of TBT-based paints in vessels <25 m in length (Evans et al. 2000) has been forbidden in many EU countries. More recently, the international marine organisation (IMO) banned the use of this kind of paints in ships, independent of length, as of 2003, and hulls protected with TBT-based paints were forbidden to enter in EU ports and harbours as of 2008 (CE, 782/2003).

As a result, paint manufacturers introduced new products. These compounds are now known as booster biocides and are added to copper oxide-based paints to improve the efficiency (Voulvoulis et al. 1999). Moreover, these compounds inhibit photosynthesis and, therefore, are growth inhibitors of freshwater and marine algae (Okamura et al. 2002).

Some of these compounds are frequently to be found in sea water samples in high levels of concentration, and their toxicological effects have been tested on non-target species (Lambert et al. 2006; Manzo et al. 2006). It can be considered that the concentrations of these new biocides need to be monitored in order to assess possible risks to the environment.

One of the major problems with environmental samples is that the conventional analytical techniques are seldom sufficient in terms of sensitivity, selectivity and reliability. In fact, reliable data depend on the total analytical procedure. The sample preparation includes various steps, the most time-consuming and labour-consuming of which are the extraction and the cleaning of the extracts.

Á. S. Rodríguez · Z. S. Ferrera · J. J. S. Rodríguez (✉)  
Department of Chemistry, Faculty of Marine Sciences,  
University of Las Palmas de Gran Canaria,  
35017 Las Palmas de Gran Canaria, Spain  
e-mail: jsantana@dqui.ulpgc.es

In this article, we present a method designed to evaluate the presence of seven booster biocides currently used in antifouling paints, in the waters of marinas and harbours on the island of Gran Canaria (Spain) using solid-phase extraction (SPE) and high-performance liquid chromatography—diode array detection (HPLC–DAD).

We optimised all the conditions that affect the process of extraction of the selected target compounds from the spiked water samples. Finally, the method was applied to the analysis of real water samples from various different ports on the island of Gran Canaria.

## Experimental

### Reagents

The individual reference standards of the booster biocides (Thiram, 4-Chloro-3-methylphenol, Diuron, TCMTB, Dichlofluanid, Chlorothalonil and Irgarol 1051) were purchased from Dr. Ehrenstorfer (Germany) at a level of over 98% purity in all cases. Stock standard solutions were prepared at 1 g/L of each analyte in methanol and stored at 4°C. Working solutions were prepared by appropriate dilution of stock solutions.

The SPE cartridges (6 mL) used in this study were Sep-Pak Vac C18 (500 mg) and Oasis HLB (200 mg) from Waters (USA), Mega BE-FL (1 g), Envirelut pesticide (500 mg) and Bond Elut-ENV (500 mg) from Varian (Spain).

The methanol HPLC gradient grade was obtained from Panreac Química S.A. (Barcelona, Spain), and the bidistilled water from Milli-Q purification unit (Millipore, USA).

### Apparatus

The chromatograph system (Varian Inc., Madrid, Spain) consists of a pump fitted with an auto-sampler and volume selector, a column valve module with an internal oven and a DAD detector. The system, acquisition and processing of data were controlled using Star software 6.5 version (Varian Inc., Madrid, Spain). The stationary-phase column was a Nova-Pak C<sub>18</sub> 150 mm × 3.9 mm of 4 μm of particle size (Waters, USA) and ChromGuard C<sub>18</sub> precolumn from Varian (Madrid, Spain). The column was placed in the column module and thermostated at 30 ± 0.2°C.

For the SPE process, a Vac Elut 20 SPE Manifold (Varian Inc., Spain) coupled to a vacuum pump was used.

### Sampling

The sea water collected to allow for the optimisation of the methodology was taken from the beach at Melenara, in the

east of the island of Gran Canaria. Extractions over blank samples were carried out to check for the absence of the analytes under study.

A total of 26 sea water samples were collected from different ports and marinas around the island of Gran Canaria in May 2007. The samples were taken to 1-metre depth, placed in 2.5-L amber-glass bottles and then stored at 4°C in the dark until extraction. Samples were filtered through 0.65-μm Durapore membranes (Millipore, USA).

### The solid-phase extraction procedure

In order to optimise the type of cartridge and volume of elution, 100-mL sea water samples were spiked with a concentration of 50 μg/L of each analyte, except Dichlofluanid (150 μg/L). The volume of sample employed was also studied. To this end, various volumes were spiked with the same amount of compound (5 μg of each one and 15 μg to Dichlofluanid).

The spiked samples were shaken in order to ensure the homogeneous distribution of analytes in the matrix and then allowed to equilibrate for 10 min prior to extraction. The cartridges were conditioned with 3 mL × 5 mL of methanol followed by 3 mL × 5 mL of bidistilled water. The samples were loaded and passed through cartridges, to an approximate flow of 10 mL/min. To remove the salts and other unknown substances, a wash step (2 mL × 5 mL of bidistilled water) was used, later the cartridges were dried under vacuum for 5 min. To extract the analytes, an optimised volume of methanol was added and passed through the sorbent at a low flow of approximately 1 mL/min.

### Liquid–liquid extraction

The liquid–liquid extraction (LLE) was employed to validate the SPE procedure developed. A similar LLE procedure to determine Irgarol 1051 in coastal marine waters (Cresswell et al. 2006) was used. Both extractions (SPE and LLE) were carried out in the same conditions. A 1 L of sea water from the beach at Melenara (previously analysed to ensure the absence of analytes) was spiked with the analytes to obtain a final concentration of 0.6 μg/L except for the case of Dichlofluanid (2.4 μg/L).

LLE was carried out as follows: 1-L spiked sample was introduced into a 2-L separatory funnel and then was sequentially extracted with Dichloromethane (2 mL × 50 mL); the time between each extraction was 5 min. Subsequently, combined extracts were dried and concentrated using a rotavapour, first in a 200-mL round bottom flask to approximately 5 mL and then in a 10-mL round bottom flask until completely dried. Finally, the analytes were redissolved in 1 mL of methanol.

## Chromatography analysis

The analysis of the extracted samples was carried out with HPLC-DAD. Thirty microlitres of sample was injected into the chromatography system. The retention times and wavelengths of the analytes used for their measurement are shown in Table 1. The mobile phase used was methanol/water (50:50 v/v) for 3 min up to a proportion of 80:20 v/v in 14 min at a flow-rate of 1 mL/min.

To ensure the presence of the booster biocides in real samples, retention times were used and comparisons made between the absorbance spectra in the sample and in the standard solution.

In order to ascertain the booster biocide concentrations in real sea water samples, the corresponding calibration curves were formed, once they had been optimised using the SPE procedure, in a concentration range between 0.05 and 4 µg/L. A linear relationship was obtained between the peak areas and the analyte concentrations, with high correlation coefficients ( $R^2 > 0.99$ ). It was also determined analytical parameters of methodology such as recoveries, limits of detection and reproducibilities.

## Results and discussion

### Solid-phase extraction optimisation

To obtain an efficient extraction of the compounds from the water samples, several parameters must be optimised, such as type of sorbent, sample volume and volume of elution.

For the type of sorbent and the volume of elution studies, we selected as preliminary conditions 100 mL of spiked sea water samples and 5 mL of methanol for elution.

### Type of sorbent

We used five different cartridges: Sep-Pak Vac C<sub>18</sub> (500 mg), Bond Elut-ENV (500 mg), Mega BE-FL (1 g), Oasis HLB (200 mg) and Envirelut pesticide (500 mg). Figure 1 illustrates the results obtained for each compound and each cartridge. These results show that C<sub>18</sub> and Envirelut Pesticide offer us higher responses over all the compounds. Bond Elut-Env was not effective in the retention of Thiram and TCMTB.

Due to the fact that the Envirelut Pesticide provided a better base line with respect to the C<sub>18</sub> cartridge; this was selected as the most suitable cartridge.

### Elution Step

The elution volume employed must be sufficient to ensure the total extraction of the analytes, but not so high that the time used in the elution and posterior drying of the sample will be unnecessarily high.

The solvent used was methanol. For an evaluation of the volume required, the elution was carried out with 1, 1.5, 2, 2.5, 5 and 8 mL of methanol. Figure 2 shows the results obtained as a normalised peak area (peak area × elution volume). These results show that a volume of 1 mL was sufficient to desorb the target of the analytes from the SPE cartridge. With 1 mL as the elution volume, the drying step can be avoided. This fact provides us with an enormous advantage: the time of the extraction process is reduced and prevents some compound loss, for example, the TCMTB presents a high vapour pressure (Voulvoulis 2006).

### Sample Volume

The sample volume may be an important parameter for efficient extraction on account of the breakthrough volume

**Table 1** Peak identification numbers in figures, retention times, absorbance wavelengths and analytical parameters for compounds under study

No	Compound	$t_R$ (min) <sup>a</sup>	$\lambda_{abs}$ (nm)	Linear range (µg/L) <sup>b</sup>	Recovery (%)	R.S.D. (%) <sup>c</sup>	L.O.D. (µg/L) <sup>d</sup>
1	Thiram	3.3	260	0.1–1.00	96	6.59	0.022
2	4-Chloro-3-methylphenol	6.7	280	0.1–1.00	103	5.35	0.075
3	Diuron	7.1	248	0.05–1.00	101	3.49	0.038
4	TCMTB	8.9	280	0.1–0.80	85	4.70	0.007
5	Chlorothalonil	10.3	230	0.1–0.80	92	5.90	0.010
6	Dichlofluanid	11.2	230	0.8–4.00	68	10.8	0.415
7	Irgarol 1051	12.4	230	0.05–1.00	93	3.75	0.031

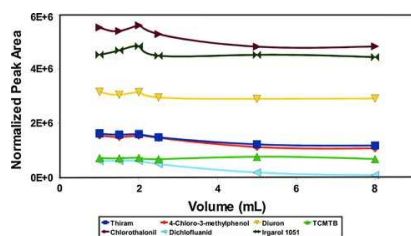
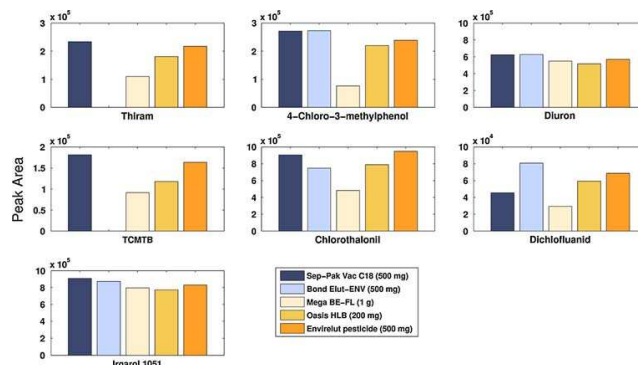
<sup>a</sup> Retention time

<sup>b</sup> Factor of preconcentration: 1,000

<sup>c</sup> Relative standard deviation ( $n = 6$ )

<sup>d</sup> Limit of detection

**Fig. 1** Results obtained for the booster biocides after elution using different SPE cartridges



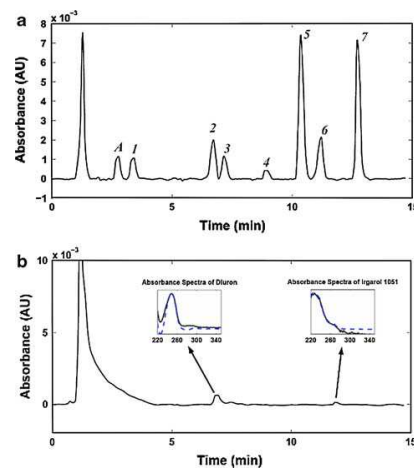
**Fig. 2** Results obtained shown as a normalised peak area (peak area  $\times$  volume of elution) for the various different volumes of elution (1, 1.5, 2, 2.5, 5 and 8 mL)

of the cartridge. Different sample volumes of 100, 500, 800, and 1,000 mL were spiked with the same amount of compound and once passed through the cartridge, they were eluted with 1 mL of methanol. Comparable areas were obtained for most compounds, except for the 4-Chloro-3-methylphenol, where the peak area increased with the volume of sea water. This may be due to a major and efficient retention of low concentrations of this analyte.

In order to obtain as great a preconcentration as is possible, a volume of 1,000 mL was chosen for the extraction procedure.

Analytical parameters

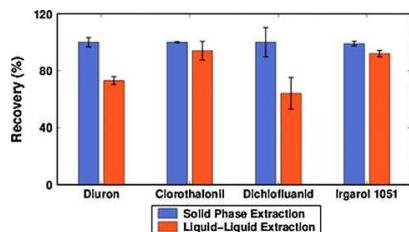
Figure 3a shows a typical chromatogram obtained for the extraction of a spiked sample. At the same time, in Fig. 3b, there is the representation of a chromatogram at  $\lambda = 248$  nm from a real sample taken from the marina at Puerto Rico (SW). In this figure, we have also represented



**Fig. 3** (a) Chromatogram obtained after extraction of 100 mL of sea water spiked with a concentration of 3.5  $\mu\text{g/L}$  for all the compounds except Dichlofluandil, with 14  $\mu\text{g/L}$  ( $\lambda_{\text{abs.}} = 230$  nm). A: the Dichlofluandil degradation product. (b) Chromatogram obtained using extraction of 1,000 mL of a real sea water sample from the marina at Puerto Rico (point C2,  $\lambda_{\text{abs.}} = 248$  nm). In the smaller boxes, we show the absorbance spectra of real sample (black line) and standard sample (blue line)

the absorbance spectra of the standard (blue dashed line) and real sample (black line).

The SPE-HPLC procedure provides recovery levels of over 85% for all the biocides, except in the case of Dichlofluandil (68%; Table 1). The relative standard



**Fig. 4** Recoveries obtained for four of the booster biocides being studied, using optimised solid-phase extraction and conventional liquid-liquid extraction

deviation (%RSD) for the recovery experiments (Table 1) was under 10%, with only the Dichlofluanid showing a value of over 10.84%.

The limits of detection (LODs) for 1000 mL of sea water sample, expressed as three times the noise of each compound (Lindsay 1992), are shown in Table 1. We can see how the LODs varied between 0.007 and 0.075 µg/L except for Dichlofluanid that showed a higher value (0.451 µg/L). These LODs are suited for detecting the presence of booster biocides in real samples along the Spanish coast, where concentrations higher than 0.1 µg/L have been found, mainly for Diuron and Irgarol (Martínez et al. 2001).

The proposed method was compared with a conventional method, in this case, liquid-liquid extraction. In Fig. 4, we can see that the results obtained for Chlorothalonil and Irgarol 1051 are similar in both procedures. However, in the cases of Diuron and Dichlofluanid, higher recoveries are obtained using the SPE methodology. Finally, we have

noted that Thiram, 4-Chloro-3-methylphenol and TCMTB could not be determined using LLE, possibly due to losses during the evaporation step.

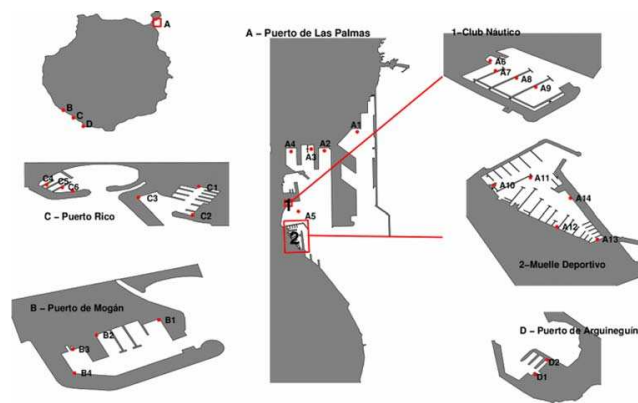
#### Determination of antifouling biocides in the sea water samples of the harbours and marinas on the island of Gran Canaria

A total of 26 sea water samples from various different ports and marinas on the island of Gran Canaria were analysed using SPE-HPLC.

The Canary Islands are a Spanish archipelago, to the north-west of the African continent, between 27.37 °N, 18.10 °W and 29.25 °N, 13.20 °W. The archipelago is a significant stop on the commercial ship routes between America, Africa and Europe; the sea traffic passes through the major islands (Gran Canaria and Tenerife), with the port of Las Palmas de Gran Canaria one of most important ports. There is also a great deal of tourism. On Gran Canaria, the marinas are basically located around the south of the island.

Figure 5 shows the different points where the samples were collected. Within area A (NE) is the port of Las Palmas de Gran Canaria and two marinas: (1) The Club Náutico, which was under construction when this study was carried out and (2) The Muelle Deportivo, which constitutes the most important marina on the island and presents heavy yachting and sailing activity. Point B (SW) is the harbour at Mogán with two zones, first (to the right of the map), the marina and second, the fishing harbour. Point C (SW) is the marina at Puerto Rico subject to heavy yachting and sporting activity associated to tourism, and D (SSW) is the Arguineguín fishing harbour.

**Fig. 5** Sample points under study



**Table 2** Analysis of sea water samples from the island of Gran Canaria

Sample	Diuron ( $\mu\text{g/L}$ ) <sup>a</sup>	Irgarol ( $\mu\text{g/L}$ ) <sup>a</sup>
A10	0.045 $\pm$ 0.003 <sup>b</sup>	–
B1	0.049 $\pm$ 0.001 <sup>b</sup>	–
B2	0.049 $\pm$ 0.001 <sup>b</sup>	–
B3	0.069 $\pm$ 0.001	–
B4	0.097 $\pm$ 0.003	–
C1	0.045 $\pm$ 0.001 <sup>b</sup>	0.033 $\pm$ 0.001 <sup>b</sup>
C2	0.078 $\pm$ 0.001	0.033 $\pm$ 0.003 <sup>b</sup>
C3	–	0.046 $\pm$ 0.001 <sup>b</sup>
C4	0.044 $\pm$ 0.003 <sup>b</sup>	–
C5	0.060 $\pm$ 0.001	–
D1	0.071 $\pm$ 0.001	–
D2	0.100 $\pm$ 0.004	–

It has been only included the points where booster biocides were detected

<sup>a</sup> Mean of two determinations  $\pm$  standard deviation

<sup>b</sup> Approximate concentrations, between the limit of detection and the limit of quantification

Table 2 shows the sample points where some of the target analytes were found. The two biocides that were most commonly found in the areas of heavy boating activity were Diuron and Irgarol 1051, whereas the other biocides under study were not to be detected in any sample. The presence of Diuron in water samples may be due to its extensive use and very low level of degradation. Irgarol 1051 was only detected at the marina of Puerto Rico. This compound also degrades slowly. Its half life ( $t_{1/2}$ ) is about 350 days in sea water (Thomas et al. 2002), and the tidal current may affect its distribution. Both Diuron and Irgarol 1051 are photosynthesis inhibitors, preventing oxygen production and show toxicological effects in non-target species such as invertebrates (Manzo et al. 2006) and macrophytes (Lambert et al. 2006).

### Conclusions

A method based on SPE and HPLC was optimised to determine the presence of antifouling biocides in sea water samples. The proposed method offers a combination of sensitivity and simplicity when compared with other conventional methods.

Applications of the developed method to the analysis of sea water samples from different harbours and marinas of the island of Gran Canaria indicate the presence of Diuron in most of the locations studied. However, Irgarol 1051 was found in a few samples. The presence of these compounds in our samples is in agreement with several studies carried out in other world locations.

**Acknowledgments** This study was funded by the Spanish Ministry of Education and Science Project Num. CTM2006/06503. Our thanks to the Las Palmas Port Authority, the Puerto Rico and the Mogán Port management for their support.

### References

- CE (2003) European directive 782/2003
- Cresswell T, Richards JP, Glegg GA, Readman JW (2006) The impact of legislation on the usage and environmental concentrations of Irgarol 1051 in UK coastal waters. *Mar Pollut Bull* 52:1169–1175
- Evans SM, Birchenough AC, Brancato MS (2000) The TBT Ban: out of the frying pan into the fire? *Mar Pollut Bull* 40:204–211
- Hoch M (2001) Organotin compounds in the environment—an overview. *Appl Geochem* 16:719–743
- Lambert SJ, Thomas KV, Davy AJ (2006) Assessment of the risk posed by the antifouling booster biocides Irgarol 1051 and diuron to freshwater macrophytes. *Chemosphere* 63:734–743
- Lindsay S (1992) High performance liquid chromatography. Wiley, New York
- Manzo S, Buono S, Cremisini C (2006) Toxic effects of irgarol and diuron on sea urchin *Paracentrotus lividus* early development, fertilization, and offspring quality. *Arch Environ Con Tox* 51:61–68
- Martínez K, Ferrer I, Hernando D, Fernández-Alba AR, Marcé RM, Borrull F, Barceló D (2001) Occurrence of antifouling biocides in the Spanish Mediterranean marine environment. *Environ Technol* 22:543–552
- Okamura H, Watanabe T, Aoyama I, Hasobe M (2002) Toxicity evaluation of new antifouling compounds using suspension-cultured fish cells. *Chemosphere* 46:945–951
- Thomas KV, McHugh M, Waldock M (2002) Antifouling paint booster biocides in UK coastal waters: inputs, occurrence and environmental fate. *Sci Total Environ* 293:117–127
- Voulvoulis N (2006) Antifouling paint booster biocides: occurrence and partitioning in water and sediments. In: Konstantinou I (ed) *The handbook of environmental chemistry- 5.0 Antifouling Paint Biocides*. Springer, New York, pp 155–170
- Voulvoulis N, Scrimshaw MD, Lester JN (1999) Alternative antifouling biocides. *Appl Organomet Chem* 13:135–143
- Yebrá DM, Kiil S, Dam-Johansen K (2004) Antifouling technology—past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Prog Org Coat* 50:75–104



## An evaluation of antifouling booster biocides in Gran Canaria coastal waters using SPE-LC MS/MS

Álvaro Sánchez Rodríguez, Zoraida Sosa Ferrera and José Juan Santana Rodríguez\*

5 *Department of Chemistry, Faculty of Marine Sciences, University of Las Palmas de Gran Canaria, 35017, Las Palmas de Gran Canaria, Spain*

*(Received 22 May 2009; final version received 18 November 2009)*

10 A solid phase extraction (SPE) technique for seawater samples coupled to quantification using liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS) is described to quantify relevant antifouling booster biocides of ecotoxicological concern (Diuron, TCMTB, Irgarol 1051 and Dichlofluanid). The optimised methodology provides a sensitive, easy to use and efficient analytical procedure with detection limits in the range of between 0.1 and 0.2 ng L<sup>-1</sup> and appropriate reproducibility (with analytical standard deviations of less than 15 10%). Spiked recoveries for all compounds exceeded 72%. The method was tested through a thorough monitoring regime of commercial port and marinas on the island of Gran Canaria (off the north-west coast of Africa) over a period of several months in 2008. Results provide the first data for antifouling booster biocides in the Canary Islands. Concentrations of Diuron and Irgarol 1051 in 20 samples ranged between 2 and 195 ng L<sup>-1</sup> and 2 and 146 ng L<sup>-1</sup>, respectively. TCMTB and Dichlofluanid were not detected.

**Keywords:** booster biocides; Diuron; TCMTB; Irgarol 1051; Dichlofluanid; SPE; LC-MS/MS; the Canary Islands

### 1. Introduction

25 The term 'biofouling' is used to refer to the undesirable accumulation of microorganisms, plants and animals on artificial surfaces immersed in water. This accumulation causes various problems, such as greater frictional resistance and deterioration of the coating, among others, with resulting economic losses [1].

30 In the late 1950s and early 1960s, tributyltin (TBT) was introduced into marine paints as an antifouling agent, proving to be highly efficient. Although due to its toxicity, several restrictions have been applied to its use. At present, the European Union (EU) has forbidden all boats painted with organotin-based paints to sail in its waters [2].

35 As a result, the manufacturers introduced other compounds, such as biocides, into their anti-fouling paint formulations. These compounds are commonly referred to as 'booster' biocides. They are added to copper oxide-based paints [3] nowadays but, in the

---

\*Corresponding author. Email: jsantana@dqui.ulpgc.es

past, were also added to TBT-based paints to improve antifouling efficiency for large vessels [4]. Some of these booster biocides are frequent compounds in agricultural and industrial products since they are used as fungicides or herbicides. However, at the time they were introduced as antifouling agents, no reliable data existed with respect to their potential toxicity, characteristics nor distribution in seawater. This lack of knowledge motivated abundant studies in this field. For example, the project running under the title of 'Assessment of Antifouling Agents in Coastal Environments (ACE)', supported by the EU [5], has contributed to know-how in the field through its numerous publications. In Spain, studies on booster biocides have largely focused on the Mediterranean coastline [6–10].

Recent studies have evaluated the toxicity of booster biocides on non-target species [11, 12]. Most booster biocides are growth inhibitors for freshwater and seawater algae [13]. For example, Diuron and Irgarol 1051, to cite two of the most frequently used booster biocides, have toxic effects on macrophytes and phytoplankton communities, at levels of  $\mu\text{g L}^{-1}$  or  $\text{ng L}^{-1}$  [14]. Both of these compounds reveal equal patterns of toxicity in the case of plants, inhibiting photosynthesis through the blockage of electron transport. Diuron and Irgarol 1051 have been measured at levels of 2190 and  $1000 \text{ ng L}^{-1}$ , respectively, in Spanish coastal waters [7,10]. Similar concentrations have also been found in other countries [15]. Such levels may affect the photosynthetic efficiency of species of great ecological importance such as *Zostera marina* [16]. The environmental consequences have led to the introduction of legal restrictions on the use of booster biocides. For example in the UK, neither Diuron nor Irgarol 1051 can be used as antifouling agents as of November 2002 [17]. Diuron, moreover, was included in the list of priority substances in the field of water policy and amending Directive 2000/60/EC of European Community [18].

The determination of these compounds is possible either by gas chromatography (GC) or high performance liquid chromatography (HPLC). Phenylureas such as Diuron degrade under gas chromatography conditions but may be determined by previous derivatisation [19], and this procedure can, thus, be used for their determination in seawater samples [20]. The most frequently used detection technique is mass spectrometry (MS) coupled with GC [8,10] or LC [7,21,22]. This technique is an excellent confirmation tool, offering high sensitivity and, when coupled with liquid chromatography, provides even greater applicability. Over the last few years, the most widely deployed technique in the case of booster biocide detection has been liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), in particular when Diuron is one of the targeted analytes [23,24].

The most common extraction methods used in seawater monitoring studies are solid phase extraction (SPE) [6,25–27] and liquid-liquid extraction (LLE) [28–30]. High preconcentration is achieved with both extraction methods and, hence, low levels of booster biocides may be detected in aqueous samples. SPE, in particular, requires only a low volume of solvents and is easy to apply, giving excellent results in most cases.

The aim of the present study is to investigate the occurrence of four common booster biocides (Diuron, TCMTB, Irgarol 1051 and Dichlofluanid) in the coastal waters of the island of Gran Canaria. To our knowledge, this is the first study of its kind, researching antifouling booster biocide concentrations in seawater samples taken from the commercial port and various different marinas in the Canary Islands. The campaign from which these data are derived took place between May and November 2008 in the marinas, the commercial port and the fishing harbours on the island of Gran Canaria. An optimised SPE-LC MS/MS methodology is employed in the determination process.

## 2. Experimental

### 85 2.1 Reagents and chemicals

Diuron, 2-(thiocyanomethylthio)benzothiazole (TCMTB), Irgarol 1051 and Dichlofluanid were purchased from Dr. Ehrenstorfer (Germany) at levels of purity over 98%. Stock standard solutions of each analyte were prepared at 1000 mg L<sup>-1</sup> in methanol, and stored at 4°C. The methanol LC-MS-grade, formic acid and ammonium formate were supplied by Panreac Química S.A. (Barcelona, Spain). The ultra-high-quality water was obtained 90 by Milli-Q purification system (Millipore, USA). The SPE cartridges (Envirelut Pesticide 500 mg) were supplied by Varian (Madrid, Spain).

### 2.2 Sampling

The blank seawater samples used in method optimisation were collected from the beach at Melenara, located in the East of the island of Gran Canaria. To ensure the absence of booster biocides in the matrix, both the extraction and determination procedures were carried out.

A total of 104 seawater samples were collected from the commercial port and various different marinas around the island of Gran Canaria between May and November, 2008. 100 All the samples were taken at 1 metre depth and stored in amber 2.5 L glass bottles at 4°C in the dark until extraction.

### 2.3 Solid phase extraction

All samples were filtered through a 0.65 µm Durapore membrane filter (Millipore, USA). The solid phase extraction procedure had been previously optimised [31]. The 105 Envirelut Pesticide cartridge was conditioned with 3 × 5 mL of methanol and 3 × 5 mL of ultra-pure water. Thereafter, a volume of 1 L was passed through a cartridge at a flow-rate of 10 mL min<sup>-1</sup>. To remove the salts retained in the cartridge, a wash step was introduced, using 2 × 5 mL of ultra-pure water. Subsequently, the cartridge was dried under vacuum for 5 minutes, and the retained analytes were eluted with 1 mL methanol at a low flow rate 110 (~1 mL min<sup>-1</sup>). Duplicate analyses were carried out for all the samples.

### 2.4 LC-ESI-MS-MS analysis

The LC-MS analyses were carried out in a Varian 320-MS LC/MS/MS system (triple quadrupole) equipped with an electrospray ionisation (ESI) interface. The stationary phase used was a Varian Pursuit UPS 2.4 C<sub>18</sub> 50 × 2.0 mm (2.4 µm particle size) column set at 40°C. The chromatographic separation was performed under isocratic conditions with 40% of 5 mM ammonium formate, acidified with 0.2% (v/v) formic acid and 60% methanol. A flow rate of 0.2 mL min<sup>-1</sup> was held for 8 minutes. A volume of 10 µL was injected under µpick-up conditions.

The mass spectrometer parameters are detailed in Table 1. The housing temperature was set at 60°C, the nebulising gas pressure at 50 psi, the drying gas pressure at 30 psi, and the shield and needle voltages at 0.6 kV and 5 kV respectively. Nitrogen was used as the nebulising and drying gas, and argon as the collision gas at a pressure of 3.87 × 10<sup>-5</sup> psi.

Table 1. Optimised MS/MS conditions and transitions selected under the MRM mode for the quantification and confirmation of booster biocides in seawater samples.

Compound	Mass	Precursor ion	Capillary (V)	Quantification ion (Coll. eV)	Confirmation ion (Coll. eV)
Diuron	232	233	52	72 (16)	160 (28)
TCMTB	238	239	30	180 (10)	136 (22)
Irgarol 1051	253	254	40	198 (11.5)	91 (22)
Dichlofluanid	332	333	52	123 (12.5)	224 (9.5)

To optimise the mass spectrometer parameters (Table 1) a standard solution of each analyte ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) was infused directly into the detector at a flow rate of  $10 \mu\text{L min}^{-1}$ . The determination of analytes was carried out under the multiple reaction monitoring (MRM) mode. The detector voltage was fixed at the maximum extended dynamic range (EDR) to optimise the signal, and the mass width was set at 2 and 1.5 amu for the first and third quadrupole respectively. The dwell time for all the transitions was 0.1 s.

Simultaneous presence of the quantification and confirmation ions and retention time based on authentic standards was used to positively identify the presence of booster biocides in real samples.

### 2.5 Calibration

To determine the analytical parameters, reproducibility and recovery experiments were carried out over six blank seawater samples spiked with the analytes, at three different levels (500, 50 and  $5 \text{ ng L}^{-1}$ ).

Calibration curves were performed on blank seawater samples fortified at six different levels between 2.5 and  $700 \text{ ng L}^{-1}$ . Subsequently, the optimised solid phase extraction procedure was applied. Correlation coefficients of over 0.995 were obtained by applying the least square method. Limits of detection (LODs) and quantification (LOQs) were calculated using a signal-to-noise ratio equal to three and ten, respectively.

## 3. Results and discussion

### 3.1 LC-MS/MS optimisation

The optimisation of the mass spectrometer parameters for the studied compounds was carried out by direct infusion into the detector. Positive (PI) and negative (NI) ionisation modes were tested. Although the TCMTB and Dichlofluanid are frequently measured in NI [32], in this case, the PI offered better signals for all the compounds.

Mass spectrometry acquisition was achieved under the MRM mode. The fragment ions in the MRM mode were produced as a result of the collision of selected precursor ions into the collision cell of the triple quadrupole. Two transitions were acquired for the confirmation of each analyte, but only one was used for quantification. The precursor ions and their product ions, used for quantification and confirmation purposes, together with the capillary voltage and collision energy are summarised in Table 1.

In the case of Diuron, the main product ion obtained was  $m/z$  72 corresponding to  $[\text{MH-C}_6\text{H}_5\text{Cl}_2\text{N}]^+$  [21]. The confirmation ion selected was  $m/z$  160. This ion has been

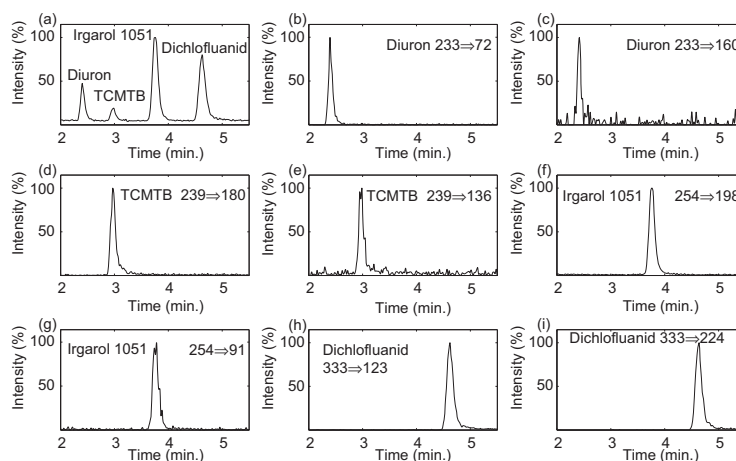


Figure 1. Total ion current (a) and selected ions (b–i) chromatogram obtained with a spiked seawater sample ( $10 \text{ ng L}^{-1}$ ) by LC-MS under MRM mode.

used on other occasions to monitor for the presence of Diuron in real samples taken from the port of Osaka [33]. For Irgarol 1051, the product ion selected for quantification was  $m/z$  198  $[\text{MH}-\text{C}_4\text{H}_8]^+$  [34], with the second ion used for confirmation criterion,  $m/z$  91. In the case of the TCMTB, the quantification and confirmation ions were  $m/z$  180  $[\text{M}-\text{SCN}]^+$  and  $m/z$  136 respectively. For Dichlofluanid, at 52 V, the main ion obtained was  $m/z$  333  $[\text{M} + \text{H}]^+$ . The product ion used for quantification was  $m/z$  123  $[\text{PhNS}]^+$  and the confirmation ion was  $m/z$  224  $[\text{M}-\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2]^+$ . Both the TCMTB and Dichlofluanid fragment ions were identified using gas chromatography mass spectrometry and electron impact ionisation [8].

Figure 1 shows a total ion current (TIC) and selected ion chromatogram obtained from the analysis of a seawater sample spiked with  $10 \text{ ng L}^{-1}$  of all the compounds.

The response of the precursor ions to the drying gas temperature was also examined. In most cases, an increased signal and rise in temperature were observed; only  $m/z$  333 (the Dichlofluanid precursor ion) decreased, probably due to its fragmentation. To avoid this, the drying gas temperature was set at  $250^\circ\text{C}$ .

### 3.2 Method performance

The method was evaluated with respect to recovery and precision, together with detection and quantification limits. Table 2 summarises the results obtained. The analyte recoveries throughout the whole process (SPE extraction and LC-MS/MS determination) were evaluated at three different concentrations (500, 50 and  $5 \text{ ng L}^{-1}$ ). The recoveries tended to decline at low levels, but adequate values ( $>72\%$ ) were obtained for all the analytes.

Table 2. Analytical parameters of the LC-MS/MS method.

Compound	500 ng L <sup>-1</sup> (n = 6)		50 ng L <sup>-1</sup> (n = 6)		5 ng L <sup>-1</sup> (n = 6)		LODs <sup>b</sup> (ng L <sup>-1</sup> )	LOQs <sup>c</sup> (ng L <sup>-1</sup> )
	Recovery (%)	RSD <sup>a</sup> (%)	Recovery (%)	RSD <sup>a</sup> (%)	Recovery (%)	RSD <sup>a</sup> (%)		
Diuron	100.6	3.3	88.0	4.6	83.7	4.2	0.1	0.4
TCMTB	91.0	3.4	93.4	6.8	79.3	6.8	0.2	0.5
Irgarol 1051	86.1	4.0	84.9	5.2	78.9	2.5	0.1	0.3
Dichlofluanid	84.0	5.7	72.8	8.3	81.8	6.0	0.1	0.3

<sup>a</sup>Relative standard deviation.<sup>b</sup>Limit of detection.<sup>c</sup>Limit of quantification.

180 These values were comparable to those given in other studies where different polymeric sorbents were used [7,35]. With respect to the Dichlofluanid, greater values were obtained than with the other SPE procedures where the relatively poor recovery rates were associated with the evaporation step [22,36]. In our case, the evaporation step was avoided by using a low volume of eluate. The relative standard deviations (RSDs) for the recovery experiments were, in all the cases analysed, under 10%, with the Dichlofluanid offering high values. This behaviour may be attributable to its fast degradation into *N'*-dimethyl-*N*-phenyl-sulphonamide (DMSA) under basic conditions [37].

185 Linearity ranges (2.5–700 ng L<sup>-1</sup>) were obtained with satisfactory correlation coefficients of over 0.995 for all the analytes. The LODs obtained ranged from 0.1 to 0.2 ng L<sup>-1</sup>. Low LOQs were also achieved, with values ranging from 0.3 to 0.5 ng L<sup>-1</sup>.

### 3.3 Determination of booster biocides in seawater samples from Gran Canaria island

190 The SPE-LC-MS/MS method was applied to samples taken from several locations in the north-east and south-southwest of the island of Gran Canaria. The samples were collected in marinas, fishing harbours and a commercial port every two months between May and November 2008.

195 Figure 2 shows the 26 sites under study. A total of 104 samples were collected. Five points (A1–A5) were sampled in the commercial harbour of Las Palmas de Gran Canaria, known as Puerto de La Luz. This harbour is one of the most important in Spain due to its location between America-Africa-Europe, on the main shipping routes. In Las Palmas de Gran Canaria, two marinas with heavy yachting activity: the Club Náutico (A6–A9) and the Muelle Deportivo (A10–A14), were also sampled. In the south of the island, three locations were selected: the Puerto de Mogán (B1–B4), used both as a marina and a fishing harbour, Puerto Rico (C1–C6) with two marinas, and the fishing harbour of Arguineguín (D1 and D2).

200 All samples with the exception of site D2 for Diuron were above the LOQs for both Diuron and Irgarol 1051. The range levels of Diuron and Irgarol 1051 found in the samples are summarised in Table 3. These booster biocides are frequently found in real seawater samples from harbours due to their widespread use. They also show low degradation in the media. By means of laboratory experiments, a half-life of 350 days has

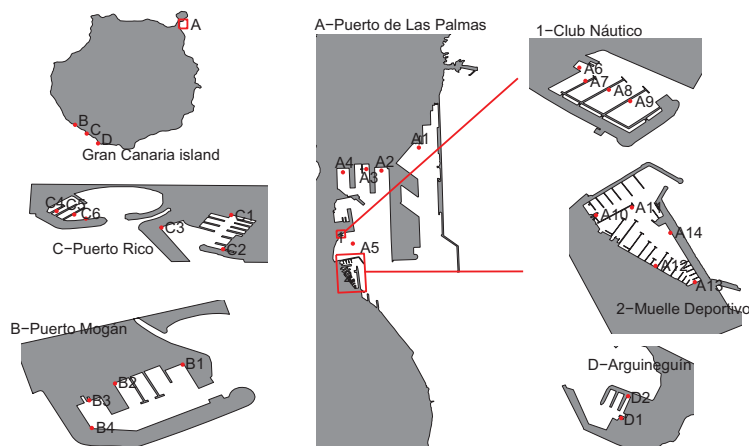


Figure 2. Sample points monitored on the island of Gran Canaria.

been established for Irgarol 1051 in seawater, whereas Diuron did not show any degradation [38]. Moreover, Harino *et al.* [39] measured no biodegradation over 13 days using bacteria culture, besides no remarkable changes as the result of sunlight irradiation over 17 days for both compounds.

The concentration levels of Diuron ranged from 2 to 195 ng L<sup>-1</sup>. The highest concentration was found at the Muelle Deportivo in the A11 sample in September. This marina is situated inside the commercial port of Las Palmas de Gran Canaria and presents intense yachting and sailing activity. Higher levels of Diuron have been found previously in various different world locations: Port Osaka (Japan) with up to 1540 ng L<sup>-1</sup> [33]; Pozzuoli Marina di Maglietta (Italy) with 475 ng L<sup>-1</sup> [22]; Veerse Meer (Denmark) at 1130 ng L<sup>-1</sup> [35]; Southampton (UK) at 6700 ng L<sup>-1</sup> [15]; and Blanes (Spain) at 2,190 ng L<sup>-1</sup> [6]. The levels found in the present study are comparable to the values reported in some of the articles studying the Spanish Mediterranean region (10–180 ng L<sup>-1</sup>) [40] or the west coast of Sweden (10–100 ng L<sup>-1</sup>) [41]. Lower levels of Diuron were recently measured along the California coast, with values ranging from <2 to 12 ng L<sup>-1</sup> [32] and from 5 to 27 ng L<sup>-1</sup> [24]. Diuron is used in other applications such as agriculture, and the marine coast levels may be the accumulated result of various different inputs [42].

With respect to Irgarol 1051, the concentration levels ranged from 2 to 146 ng L<sup>-1</sup>. The highest concentrations were measured at the Marina of Puerto Rico in May and July, although a high concentration was also measured in Mogán (July, 135 ng L<sup>-1</sup>). These two marinas are in the south of the island and show significant tourist activity. In real samples, levels of up to 4200 ng L<sup>-1</sup> have been found in the coastal waters of Singapore [43], up to 1421 ng L<sup>-1</sup> along the southern coast of the UK [15] and up to 1000 ng L<sup>-1</sup>

Table 3. Range levels, mean and standard deviation of Diuron and Irgarol 1051 for each harbour and month expressed as ng L<sup>-1</sup>. Sample values are the mean of two determinations.

Simple area	Date	Diuron	Mean	Standard deviation	Irgarol 1051	Mean	Standard deviation
Puerto de La Luz (A1-A5)	May (2008)	3.6-22.2	9.2	7.4	2.4-5.9	3.2	1.5
Club Náutico (A6-A9)		17.6-41	30.7	11.4	7.9-12.4	10.1	1.8
Muelle Deportivo (A10-A14)		52.6-113	70.3	24.9	24.9-50.7	33.7	11.5
Mogán (B1-B4)		4.5-9.2	6.5	2.3	8.2-40.9	24.1	14.7
Puerto Rico (C1-C6)		5.1-37.1	21.0	12.6	14.8-145.8	66.2	54.7
Arguinegún (D1-D2)		<LOQ <sup>a</sup> -23	23.0	- <sup>b</sup>	6.3-11.8	9.1	3.9
Puerto de La Luz (A1-A5)	July (2008)	18.1-55.2	36.9	15.6	3.2-6.4	5.2	1.2
Club Náutico (A6-A9)		14.7-46.6	25.9	14.1	4.4-9.9	6.8	2.7
Muelle Deportivo (A10-A14)		27.5-111.2	53.7	15.0	7.3-29.3	20.0	9.4
Mogán (B1-B4)		12-93.1	39.3	37.2	25.9-134.6	67.2	47.3
Puerto Rico (C1-C6)		2.3-24.4	13.3	8.7	15.2-146.5	61.6	48.6
Arguinegún (D1-D2)		9.6-34.5	22.1	17.6	3.3-11.5	7.4	5.9
Puerto de La Luz (A1-A5)	September (2008)	8.4-19.1	13.7	4.8	3.8-9.5	6.1	2.1
Club Náutico (A6-A9)		26.7-155.2	72.3	56.7	14.6-46.7	25.1	14.6
Muelle Deportivo (A10-A14)		52-195	126.3	47.1	12.5-37.5	28.0	7.4
Mogán (B1-B4)		11.7-34.4	23.4	12.4	11.7-52.5	28.8	17.3
Puerto Rico (C1-C6)		13.7-34.7	24.0	8.4	24-89.3	48.8	27.5
Arguinegún (D1-D2)		11.7-59.4	35.5	33.7	7.1-16.9	12.0	6.9
Puerto de La Luz (A1-A5)	November (2008)	19.6-28.4	23.2	3.5	10.1-51.6	29.3	17.5
Club Náutico (A6-A9)		40-47.5	43.7	3.1	46.9-72.1	57.7	11.3
Muelle Deportivo (A10-A14)		20.6-80.8	44.8	23.9	12.4-50.5	23.9	15.5
Mogán (B1-B4)		10.1-25	16.9	6.9	8.2-17.8	14.0	4.6
Puerto Rico (C1-C6)		2.4-15.2	7.7	5.0	10-54.2	27.4	15.6
Arguinegún (D1-D2)		22.1-31.2	26.6	6.5	18.8-19.7	19.2	0.6

<sup>a</sup>below the limit of quantification.

<sup>b</sup>not calculated.



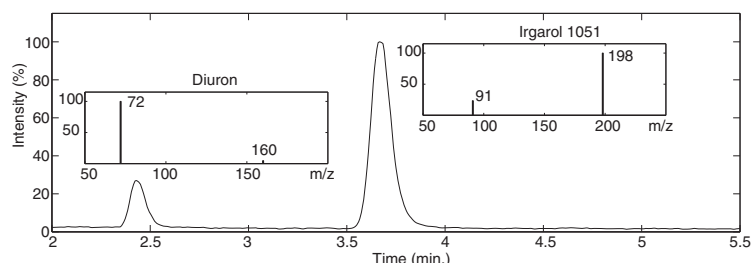


Figure 3. Total ion current (TIC) chromatogram corresponding to real samples coming from the Puerto Rico marina (point C1) the presence of Diuron and Irgarol 1051 can be observed as the first and second peak respectively. The small boxes represent selected ions measured under the MRM mode present in each peak.

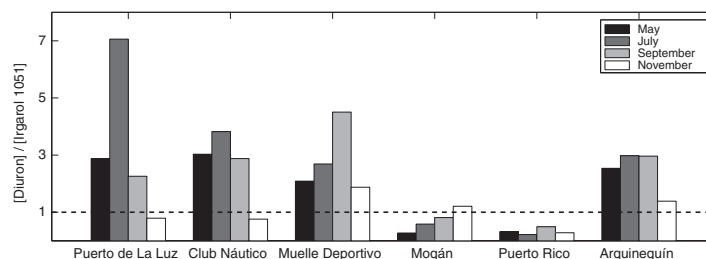


Figure 4. Evolution over time of the Ratio between Diuron and Irgarol 1051 (Diuron/Irgarol 1051) for each harbour.

in south-east Spain [10]. The concentrations measured in this study concord with values found in the Spanish Mediterranean region [44,45].

Figure 3 shows a TIC chromatogram and spectrum with selected ion monitoring under the MRM mode of the C1 sample collected in May. This figure denotes the presence of Diuron and Irgarol 1051.

The Puerto de La Luz is a commercial harbour with an area on a higher level where the pollutants possibly disperse. This may explain the low levels of both biocides found, although at point A1, opposite a shipyard, high values of Diuron were measured.

Irgarol 1051 levels gave highest values in November in the Puerto de La Luz (up to 51 ng L<sup>-1</sup>) and the Club Náutico (up to 72 ng L<sup>-1</sup>) (Table 3). As reported in previous studies, a strong polluting input may be derived from shipyard activities in the coldest months [46]. In contrast, the highest levels in Puerto Rico and Mogán were detected in the summer, when tourism increases.

With respect to the ratio between Diuron and Irgarol 1051 concentrations (Figure 4), values higher than 1 were obtained for all the ports, with the exception of Mogán

and Puerto Rico. This does not tally with the results obtained in other work [22,25]. On the other hand, in November, the ratio decreases for the Puerto de La Luz, Arguineguín, the Club Náutico and the Muelle Deportivo from values higher than 1 to values close to 1.

250 Dichlofluanid and TCMTB were not found in the samples analysed. Dichlofluanid has been measured in seawater in other locations such as the coast of Spain [7] and in Greek marinas [47]. This compound offers a high degradation rate due to its instability in alkaline aqueous media such as seawater, and presents low solubility with an elevated octanol/water coefficient ( $\log K_{ow} = 3.7$ ). These characteristics make it difficult to measure  
255 Dichlofluanid in real seawater samples, in spite of its widespread use. With respect to the occurrence of TCMTB, this compound has been previously investigated in other areas and has been not detected in seawater samples [7,9,25,36,38].

Several studies have proved the severe toxicity of Irgarol 1051 for aquatic autotrophs. Levels over  $136 \text{ ng L}^{-1}$  may cause serious damage to some phytoplanktonic algae such as the freshwater diatom *Navicula pelliculosa* [48], whereas concentrations as low as  $63 \text{ ng L}^{-1}$   
260 may decrease the photosynthetic activity of periphyton communities [41]. Levels of  $180 \text{ ng L}^{-1}$  affect the photosynthetic efficiency of *Zostera Marina* [49]. With respect to Diuron, concentrations in the range of 100 to  $1000 \text{ ng L}^{-1}$  significantly limit the photosynthesis in the seagrass species *Halophila ovalis* and *Zostera capricornis* [50].  
265 In addition, the combination of both biocides may provoke synergic [51] or additive effects [16]. The concentration found in the coastal waters of Gran Canaria exceeded these levels in some cases and, as summarised above, similar or greater concentrations are frequently given. For this reason, several countries have already limited or forbidden the antifoulant use of Irgarol 1051 and Diuron. The Dutch authorities have established a maximum permissible concentration (MPC) of  $430 \text{ ng L}^{-1}$  for Diuron  
270 and proposed  $24 \text{ ng L}^{-1}$  for Irgarol 1051 [35]. In our study, no sample presented a higher value than the MPC for Diuron, but 40% of the samples were over the MPC for Irgarol 1051.

#### 4. Conclusions

275 The concentration of biocides leached from antifouling paint coatings have been monitored in many developed countries. Up to the present, no data have been available with respect to the concentration of booster biocides in the coastal waters of the island of Gran Canaria (the Canary Islands, Spain). The toxicity of these compounds may affect primary producers, thus making it necessary for them to be monitored and controlled.

280 In this study, a solid phase extraction (SPE) procedure coupled with LC/MS-MS was used to determine the presence of common booster biocides in the coastal waters of the island of Gran Canaria. The results of these measurements indicated that the levels of biocides found (Diuron and Irgarol 1051) are comparable with those detected in other locations. These concentrations often exceeded the limits fixed under the legislation of  
285 other countries. There was also an observed trend over time in the levels of booster biocides. High concentrations of Irgarol 1051 were measured in July in Mogán and Puerto Rico, and in November at the Puerto de La Luz and the Muelle Deportivo. The highest levels of Diuron, on the contrary, were found in the marinas of Las Palmas de Gran Canaria at the end of the summer.

290 **Acknowledgements**

This study was funded by the Spanish Ministry of Education and Science, Project No. CTM2006/06503. Our thanks go to the Las Palmas port authorities and to the Puerto Rico and Mogán port management for their support.

**References**

- 295 [1] D.M. Yebra, S. Kiil, and K. Dam-Johansen, *Prog. Org. Coat.* **50**, 75 (2004).  
[2] European Directive 782/2003.  
[3] N. Voulvoulis, M.D. Scrimshaw, and J.N. Lester, *Appl. Organomet. Chem.* **13**, 135 (1999).  
[4] J.W. Readman, in *Antifouling Paint Biocides*, edited by I. Konstantinou (Springer, London, 2006).
- 300 [5] European Commission Project MAS3-CT98-00178. <http://web.pmL.ac.uk/ace/>.  
[6] K. Martínez, I. Ferrer, D. Hernando, A.R. Fernández-Alba, R.M. Marcé, F. Borrull, and D. Barceló, *Environ. Technol.* **22**, 543 (2001).  
[7] K. Martínez, I. Ferrer, and D. Barceló, *J. Chromatogr. A* **879**, 27 (2000).  
[8] A. Agüera, L. Piedra, M.D. Hernando, and A.R. Fernandez-Alba, *J. Chromatogr. A* **889**, 261 (2000).
- 305 [9] I. Ferrer and D. Barceló, *J. Chromatogr. A* **854**, 197 (1999).  
[10] M.D. Hernando, L. Piedra, A. Belmonte, A. Agüera, and A.R. Fernández-Alba, *J. Chromatogr. A* **938**, 103 (2001).  
[11] S. Manzo, S. Buono, and C. Cremsini, *Arch. Environ. Con. Tox.* **51**, 61 (2006).
- 310 [12] S.J. Lambert, K.V. Thomas, and A.J. Davy, *Chemosphere* **63**, 734 (2006).  
[13] H. Okamura, T. Watanabe, I. Aoyama, and M. Hasobe, *Chemosphere* **46**, 945 (2002).  
[14] I.K. Konstantinou and T. A. Albanis, *Environ. Int.* **30**, 235 (2004).  
[15] K.V. Thomas, T.W. Fileman, J.W. Readman, and M.J. Waldock, *Mar. Pollut. Bull.* **42**, 677 (2001).
- 315 [16] J.C. Chesworth, M.E. Donkin, and M.T. Brown, *Aquat. Toxicol.* **66**, 293 (2004).  
[17] Health and Safety Executive, Information Document HSE 730/15:13.  
[18] European Directive 2455/2001.  
[19] E.S. Tanaka and R.G. Wien, *J. Chromatogr.* **87**, 85 (1973).
- 320 [20] N. Voulvoulis, M.D. Scrimshaw, and J.N. Lester, *Chromatographia* **50**, 353 (1999).  
[21] R.A. Gimeno, C. Aguilar, R.M. Marcé, and F. Borrull, *J. Chromatogr. A* **915**, 139 (2001).  
[22] G.D. Landa, G. Ansanelli, R. Ciccoli, and C. Cremsini, *Mar. Pollut. Bull.* **52**, 1541 (2006).  
[23] Y. Kitada, H. Kawahata, A. Suzuki, and T. Oomori, *Chemosphere* **71**, 2082 (2008).  
[24] Y. Sapozhnikova, E. Wirth, N. Singhasemanon, J. Bacey, and M. Fulton, *J. Environ. Monit.* **10**, 1069 (2008).
- 325 [25] K.V. Thomas, T.W. Fileman, J.W. Readman, and M.J. Waldock, *Mar. Pollut. Bull.* **42**, 677 (2001).  
[26] C. Hamwijk, A. Schouten, E.M. Foekema, J.C. Ravensberg, M.T. Collombon, K. Shmidt, and M. Kugler, *Chemosphere* **60**, 1316 (2005).  
[27] C. Guitart, A. Sheppard, T. Frickers, A.R.G. Price, and J.W. Readman, *Mar. Pollut. Bull.* **54**, 226 (2007).
- 330 [28] N. Voulvoulis, M.D. Scrimshaw, and J.N. Lester, *Mar. Pollut. Bull.* **40**, 938 (2000).  
[29] T. Cresswell, J.P. Richards, G.A. Glegg, and J.W. Readman, *Mar. Pollut. Bull.* **52**, 1169 (2006).  
[30] P.R. Gardinali, M. Plasencia, S. Mack, and C. Poppell, *Mar. Pollut. Bull.* **44**, 781 (2002).  
[31] Á. Sanchez, Z. Sosa, and J. Santana, *Environ. Chem. Lett.* Submitted paper.
- 335 [32] Y. Sapozhnikova, E. Wirth, K. Schiff, J. Brown, and M. Fulton, *Mar. Pollut. Bull.* **54**, 1972 (2007).  
[33] H. Harino, Y. Mori, Y. Yamaguchi, K. Shibata, and T. Senda, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **48**, 303 (2005).

- [34] L. Piedra, A. Tejedor, M.D. Hernando, A. Aguera, D. Barceló, and A. Fernandez-Alba, *Chromatographia* **52**, 631 (2000).
- [35] M.H. Lamoree, C.P. Swart, A. van der Horst, and B. van Hattum, *J. Chromatogr. A* **970**, 183 (2002).
- [36] K.V. Thomas, *J. Chromatogr. A* **825**, 29 (1998).
- [37] A.P. van Wezel and P. van Vlaardingen, *Aquat. Toxicol.* **66**, 427 (2004).
- [38] K.V. Thomas, M. McHugh, and M. Waldock, *Sci. Total Environ.* **293**, 117 (2002).
- [39] H. Harino, M. Kitano, Y. Mori, K. Mochida, A. Kakuno, and S. Arima, *J. Mar. Biol. Ass. UK* **85**, 33 (2005).
- [40] I. Ferrer, B. Ballesteros, M.P. Marco, and D. Barceló, *Environ. Sci. Technol.* **31**, 3530 (1997).
- [41] B. Dahl and H. Blanck, *Mar. Pollut. Bull.* **32**, 342 (1996).
- [42] G.D. Landa, L. Parrella, S. Avagliano, G. Ansanelli, E. Maiello, and C. Cremisini, *Water, Air, Soil Pollut.* **200**, 305 (2009).
- [43] C. Basheer, K.S. Tan, and H. Lee, *Mar. Pollut. Bull.* **44**, 697 (2002).
- [44] E. Pocurull, L. Brossa, F. Borrull, and R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A* **885**, 361 (2000).
- [45] I. Ferrer and D. Barceló, *J. Chromatogr. A* **926**, 221 (2001).
- [46] J.C. Bowman, J.W. Readman, and J.L. Zhou, *Mar. Pollut. Bull.* **46**, 444 (2003).
- [47] V.A. Sakkas, I.K. Konstantinou, D.A. Lambropoulou, and T.A. Albanis, *Environ. Sci. & Pollut. Res.* **9**, 327 (2002).
- [48] L. Hall, J. Giddings, K. Solomon, and R. Balcomb, *Crit. Rev. Toxicol.* **29**, 367 (1999).
- [49] A. Scarlett, P. Donkin, T.W. Fileman, and R.J. Morris, *Mar. Pollut. Bull.* **38**, 687 (1999).
- [50] D. Haynes, P. Ralph, J. Prange, and B. Dennison, *Mar. Pollut. Bull.* **41**, 288 (2000).
- [51] A.R. Fernández-Alba, M.D. Hernando, L. Piedra, and Y. Chisti, *Anal. Chim. Acta* **456**, 303 (2002).

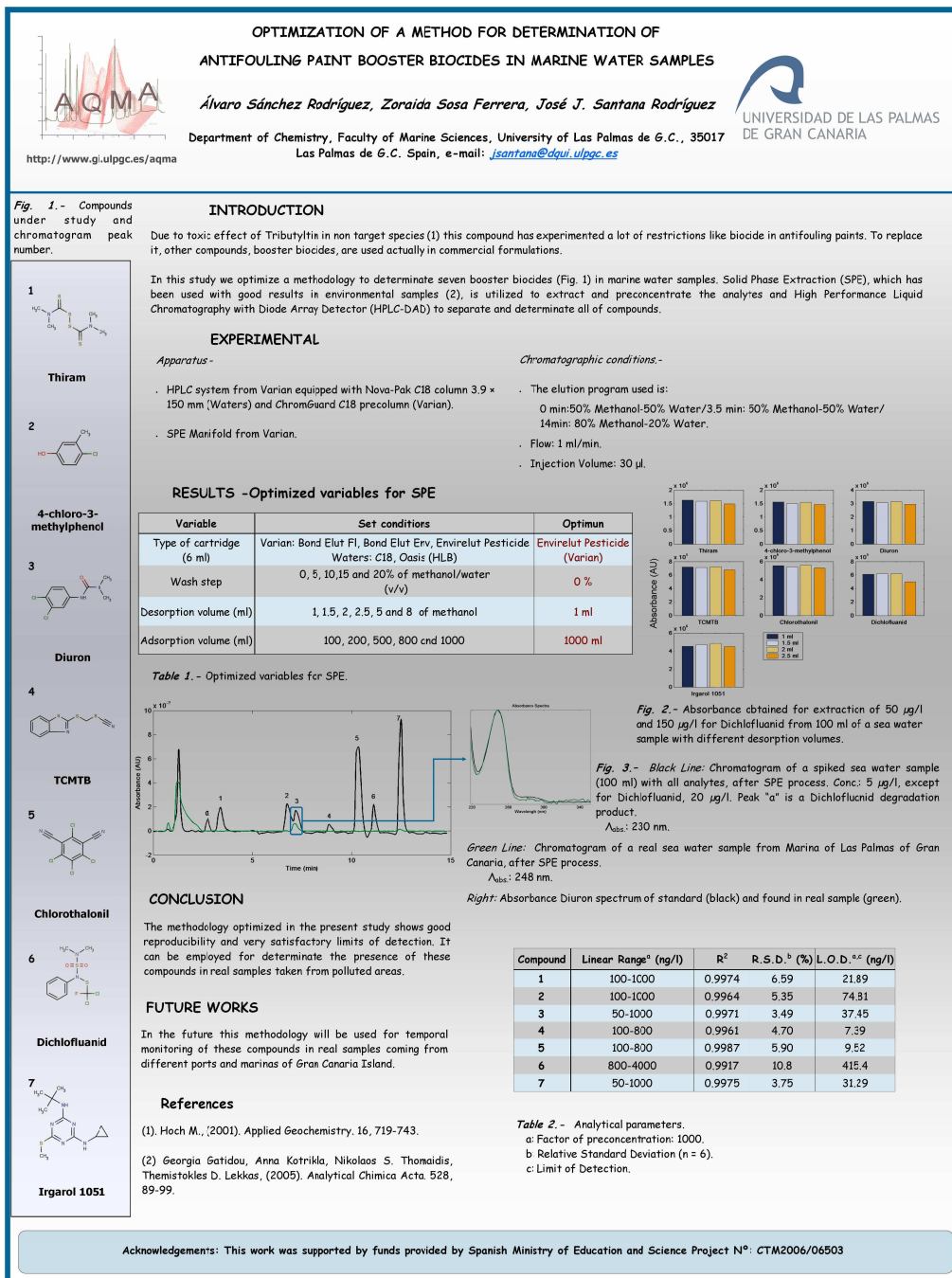
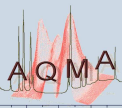


Figura B.1.- International Symposium in Marine Sciences 2007 (ISMS 2007).



AN APPROACH OF THE LEVELS OF COTAMINATION BY THE PRESENCE OF ANTIFOULING BOOSTER BIOCIDES IN MARINE WATER SAMPLES COMING FROM PORTS AND MARINAS OF GRAN CANARIA ISLAND



Álvaro Sánchez Rodríguez, Zoraida Sosa Ferrera, José J. Santana Rodríguez

Department of Chemistry, Faculty of Marine Sciences, University of Las Palmas de G.C., 35017 Las Palmas de G.C. Spain, e-mail: [jsantana@dqui.ulpgc.es](mailto:jsantana@dqui.ulpgc.es)

INTRODUCTION

Tributyltin (TBT) has been used in antifouling paints formulations since, 1970. This compound has showed toxicological effects in no target species [1]. Actually, others compounds known like antifouling booster biocides are been utilized. The majority of them has been employed previously like herbicides or fungicides and also presents a high toxicity in non target species like macrophytes [2] and invertebrates [3].

In this study, a previously optimized SPE-HPLC method for extraction and determination of seven common booster biocides (Table 1) of marine water samples has been employed. Real samples are taken from different ports and marinas of Gran Canaria Island (Figure 1).

EXPERIMENTAL

The best conditions obtain for the optimized method were:

- Sample volume: 1000 ml
- Volume desorption: 1 ml of methanol
- Cartridge: Envirelu® Pesticide 6ml (Varian)
- Wash step: 10 ml of Bidestilled water.

For the determination was employed HPLC with a Diode Array Detector (DAD).

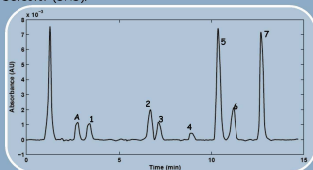


Figure 2.- Chromatogram obtained for extraction of 100 ml of sea water spiked with a concentration of 3.5 µg/l for all compounds except Dichlofluandil with 14 µg/l ( $\lambda_{abs} = 230$  nm). Peak A is a degradation product of Dichlofluandil.

Figure 3.- Chromatograms of real samples:

- Green Line: Chromatogram at  $\lambda_{abs} = 248$  nm of C5 sample (July).
- Red Line: Chromatogram at  $\lambda_{abs} = 230$  nm of C6 sample (July).
- Blue Line: Chromatogram at  $\lambda_{abs} = 230$  nm of C2 sample (May).

Nº	Compound
1	Thiram
2	4-chloro-3-methylphenol
3	Diuron
4	TCMTB
5	Chlorothalonil
6	Dichlofluandil
7	Irgarol 1051

Table 1.- Antifouling Booster Biocides under study.

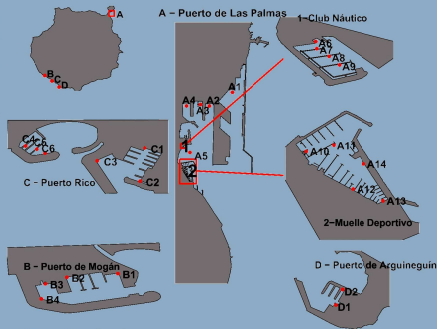
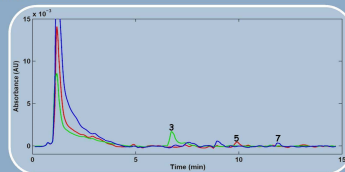


Figure 1.- Sample points.

RESULTS

The previously optimized method was employed for the study of, in a first approximation, the presence of antifouling booster biocides in some Gran Canaria's ports and marinas between months of May and July of 2007.



Samples	May (ng/l) <sup>a</sup>	July (ng/l) <sup>a</sup>
A11	—	69.6 ± 0.4
A12	—	61.7 ± 0.2
A13	—	65.5 ± 3.4
B3	69.3 ± 0.7	61.0 ± 1.9
B4	96.7 ± 3.1	—
C2	78.3 ± 1.0	50.6 ± 1.2
C4	—	61.0 ± 1.0
C5	60.4 ± 1.0	207.3 ± 2.6
D1	71.1 ± 0.3	—
D2	100.1 ± 3.5	61.0 ± 0.3

Table 2.- Concentrations of Diuron found between May and July.  
a: Mean of two extractions ± standard deviation.

CONCLUSIONS

- The method employed is useful to determination of the analytes in real samples.
- The compound most commonly found in analyzed samples was Diuron. This can be due to its low degradation and extensive use.
- Other compounds found in real samples were Irgarol 1051 and Chlorothalonil.

Acknowledgements: Spanish Ministry of Education and Science for Project N°: CTM2006/06503 and Cabildo Insular de G.C. for research grant to Álvaro Sánchez Rodríguez.

REFERENCES

- Hoch M. *Applied Geochemistry* 16 (2001) 719.
- Lambert S.J., K.V. Thomas and A.J. Davy. *Chemosphere*. 63 (2006) 734.
- Manzo S., S. Buono and C. Cremisini. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51 (2006) 61.

Figura B.2.- IX Internacional Symposium on Analytical Methodology in Environmental Field.

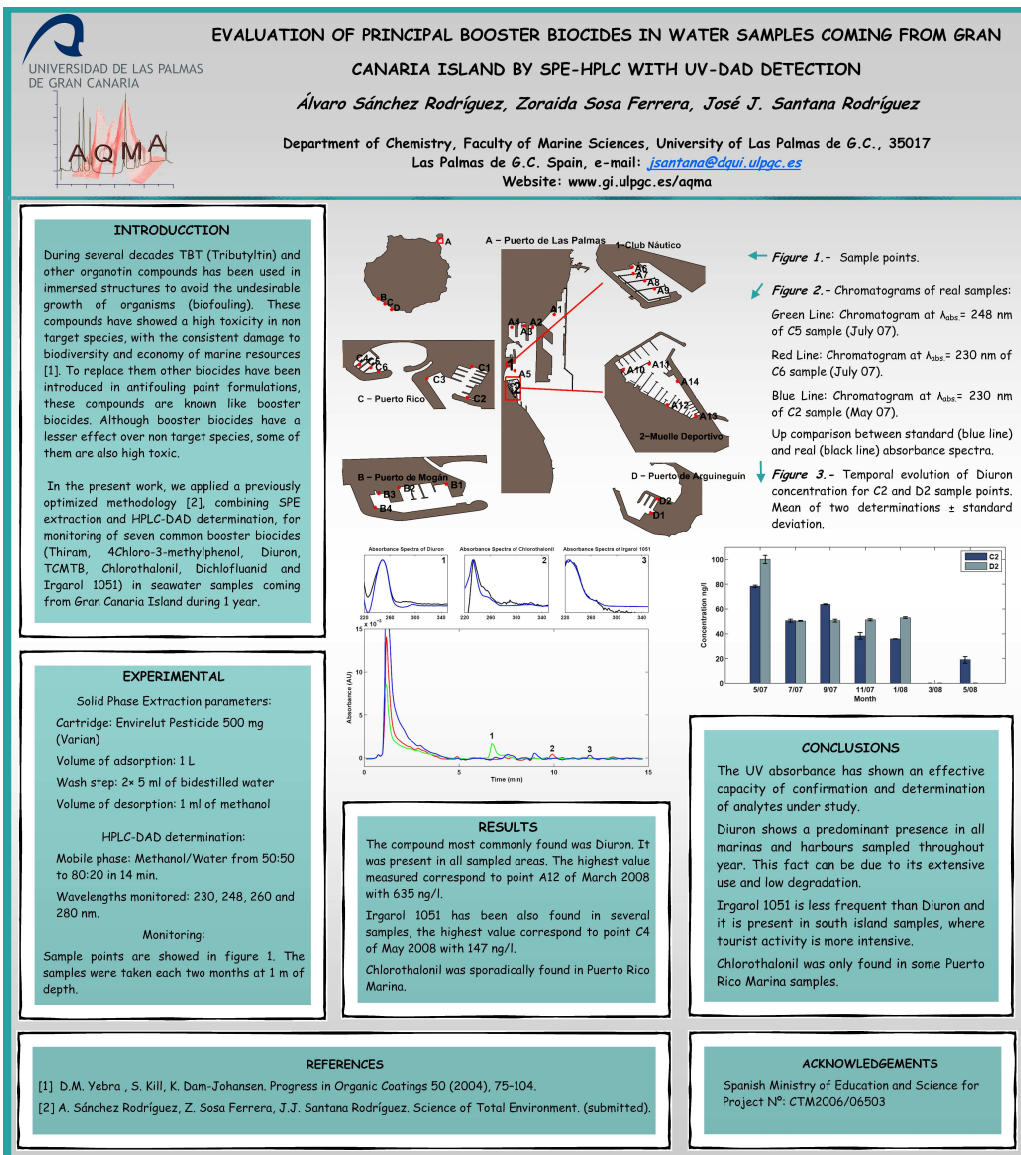


Figura B.3.- XXI Reunión Nacional de Espectroscopia V Congreso Ibérico de Espectroscopía.

**DETERMINATION OF IRGAROL 1051 AND DIURON IN MARINE WATER SAMPLES COMING FROM GRAN CANARIA ISLAND BY SOLID PHASE EXTRACTION AND LC-ESI-MS/MS.**

Álvaro Sánchez Rodríguez, Zoraida Sosa Ferrera, José J. Santana Rodríguez

Department of Chemistry, Faculty of Marine Sciences, University of Las Palmas de G.C., 35017 Las Palmas de G.C. Spain, e-mail: [jsantana@dqui.ulpgc.es](mailto:jsantana@dqui.ulpgc.es)  
Website: [www.gi.ulpgc.es/aqma](http://www.gi.ulpgc.es/aqma)

**INTRODUCTION**

From 1970, to avoid the growth of aquatic organisms on vessels hulls, Tributyltin (TBT) has been added to antifouling paint formulations. Due to its toxic effects over marine organisms, their use has been banned in EU and other countries. To replace them, other compounds have been introduced in antifouling paint formulations as biocides. These compounds are known as Booster biocides and they also have toxic effects over non target species like macrophytes [1] and invertebrates [2]. Diuron and Irgarol 1051 are common Booster biocides and their presence is frequent in harbour and marina environments. For this reason is necessary develop and apply methodologies that provide us information over their concentrations and distribution.

In the present work we coupled a previously optimized solid phase extraction process for common Booster biocides (Diuron and Irgarol 1051) to LC-MS/MS. Finally the method is applied to a real seawater samples coming from different harbours and marinas of Gran Canaria Island taken in May of 2008. The results show a predominant presence of Diuron and Irgarol 1051 in all samples collected.

**EXPERIMENTAL**

**Solid Phase Extraction parameters:**  
Cartridge: Envirelut Pesticide 500 mg (Varian)  
Volume of adsorption: 1 L  
Wash step: 2x 5 ml of bidestilled water  
Volume of desorption: 1 ml of methanol

**LC MS/MS determination:**  
Mobile phase: 40 % A—60 % B.  
A: Water (5 mM of Anionium formate and 0.2% of Formic Acid)  
B: Methanol

Stationary phase: Varian Pursuit UPS 2.1 C18 50x2.0 mm (2.4 μm of particle size) set at 40 °C.

Monitoring:  
Sample points are showed in figure 1. The samples were taken at 1 m of depth during May of 2008.

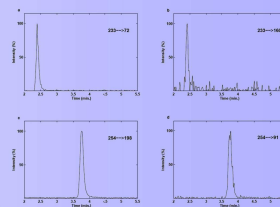
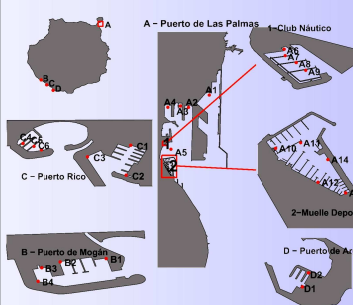


Fig. 1: Sample points.

Fig. 2: Selected ions chromatograms obtain for a spiked seawater sample by LC-MS/MS under MRM mode.

Table 1: Mass Spectrometer parameters for analytes under study.

**RESULTS**

Diuron and Irgarol 1051 were the booster biocides found in all sample areas.  
Concentrations of Diuron are greater than Irgarol 1051 in the sample area A, whereas in the south of island (B,C,D) Irgarol 1051 concentrations are higher.

Compound	Mass	Precursor Ion	Capillary (V)	Product Ion	Coll. (eV)	% Ratio
Diuron	232	233	52	72	16	5,00%
				160	28	
				198	11,5	
Irgarol 1051	253	254	40	91	22	24,00%

**CONCLUSIONS**

Diuron and Irgarol 1051 are often found in sampled areas due to its extensively use as biocide in antifouling paint formulations and low degradation in the environment.  
The use of LC-MS/MS technique offer us a great power of confirmation and low limits of detection necessary to this monitoring.

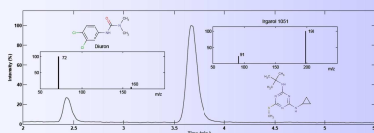


Fig. 3: TIC chromatogram from C2 sample.

Table 3: levels (ng/l) of Diuron and Irgarol 1051 found in samples monitoring during May of 2008.

n.d.: no detected. Mean of two measurements.

Sample	Diuron	Irgarol 1051	Sample	Diuron	Irgarol 1051
A1	22,2	2,4	A14	113,0	50,7
A2	7,4	2,7	B1	4,5	40,9
A3	7,0	2,4	B2	4,7	31,1
A4	6,1	5,9	B3	9,2	8,2
A5	3,6	2,7	B4	7,8	16,0
A6	17,6	7,9	C1	37,1	48,0
A7	41,0	10,2	C2	18,9	20,5
A8	24,6	10,1	C3	9,9	14,8
A9	39,6	12,4	C4	22,1	145,9
A10	64,9	40,2	C5	33,2	122,3
A11	68,3	27,7	C6	5,1	46,1
A12	52,6	24,8	D1	23,0	11,8
A13	52,6	24,8	D2	n.d.	6,3

**References:**

- [1] Lambert S. J., K.V. Thomas and A.J. Day. Chemosphere. 63 (2006) 734-743.
- [2] Manzo S., S. Buono and C. Cremisini. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 51 (2006) 61-68.

Acknowledgements: This work was supported by funds provided by Spanish Ministry of Education and Science Project N°: CTM2006/06503

Figura B.4 .- XXII Jornadas De Análisis Instrumental.



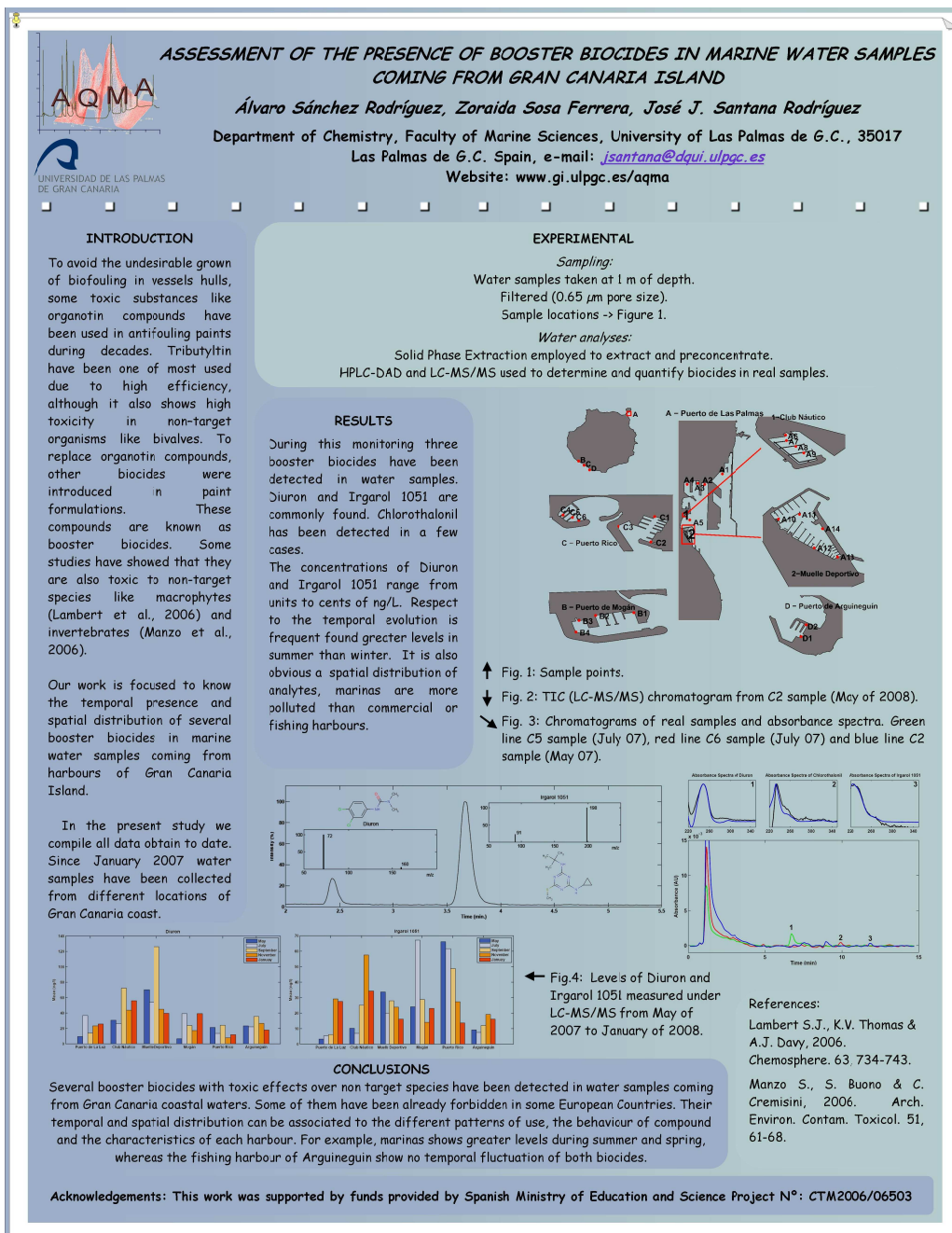
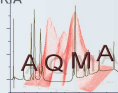


Figura B.5.- International Symposium in Marine Sciences 2009 (ISMS 2009).



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS  
DE GRAN CANARIA



## COMBINATION OF SPE AND LC-MS/MS FOR MONITORING OF SELECTED BOOSTER BIOCIDES IN COASTAL WATERS OF GRAN CANARIA ISLAND.

Álvaro Sánchez Rodríguez, Zoraida Sosa Ferrera, José J. Santana Rodríguez

Department of Chemistry, Faculty of Marine Sciences, University of Las Palmas de G.C., 35017  
Las Palmas de G.C. Spain, e-mail: [jsantana@dqui.ulpgc.es](mailto:jsantana@dqui.ulpgc.es)  
Website: [www.gi.ulpgc.es/aqma](http://www.gi.ulpgc.es/aqma)

### INTRODUCTION

Due to TBT ban as antifouling agent, others biocides have been introduced in the paint formulations to ship hulls. These biocides are known as booster biocides and they also present toxic effects in aquatic species like invertebrates [1].

The present study describes the presence of four booster biocides (Diuron, TCMTB, Dichlofluanid and Irgarol 1051) in marine water samples coming from harbours of Gran Canaria island. For this purpose, a SPE process combined with LC-MS/MS technique has been selected for the preconcentration and determination of target compounds, showing to be an efficient approach.

The developed method is applied from May 2008 to May 2009 in different water samples. They have been taken each two months in different locations as fishery harbours, commercial ports and marinas. The results obtained to date show a predominant presence of Diuron and Irgarol 1051, with concentrations ranged from 2 to 200 and from 2 to 145 ng/L respectively.

### EXPERIMENTAL

Solid Phase Extraction parameters previously optimized [2]:

Cartridge: Envirelul Pesticide 500 mg (Varan)

Volume of adsorption: 1 L

Wash step: 2 x 5 ml of bidistilled water

Volume of desorption: 1 ml of methanol

LC MS/MS determination:

Mobile phase: 40 % A—60 % B.

A: Water (5 nM of Amonium formate and 0.2% of Formic Acid)

B: Methanol

Stationary phase: Varian Pursuit UPS 2.4 C18 50x2.0 mm (2.4 µm of particle size) set at 40 °C.

Monitoring:

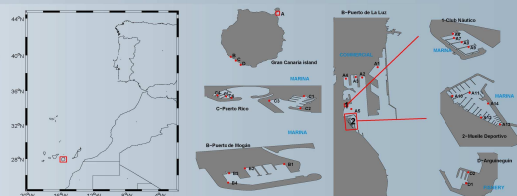
Sample points are showed in Figure 1. The samples were taken at 1 m of depth from May of 2008 to May of 2009 (n=182).

### RESULTS

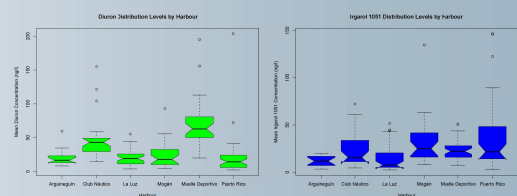
- Diuron and Irgarol were measured in all samples analyzed. Their levels ranged from units to cents of ng/L. No concentration of Dichlofluanid and TCMTB was detected in any sample.
- Respect to Diuron distribution, the Muelle Deportivo marina was the harbour with the highest concentrations (figure 2), Club Náutico also showed high values.
- In Puerto Rico marina were found the greatest concentrations of Irgarol 1051, but no evident pattern of distribution can be observed.
- The temporal evolution (Figure 3) of Irgarol 1051 in Mogón and Puerto Rico marinas can be associated to tourist activity, with low concentrations in November and January and high from May to September. Usually Irgarol levels exceeds the maximum permissible concentration (24 ng/L) proposed by Dutch authorities [3].
- Marinas showed a greater pollution of both booster biocides than commercial and fishing harbours.

### CONCLUSIONS

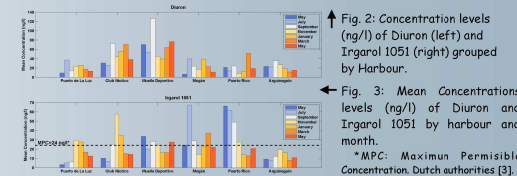
The harbours sampled showed a permanent presence of Diuron and Irgarol in theirs waters. The spatial and temporal distribution of both compounds seems to be influenced by the harbour. The marinas present greater concentration of both than the commercial and fishery harbour monitored. Irgarol 1051 is frequently found at levels upper than 24 ng/L (MPC) and its combination with Diuron could be affect to aquatic organisms. The future studies will included a statistical analysis to determine significant differences between harbour types and seasons.



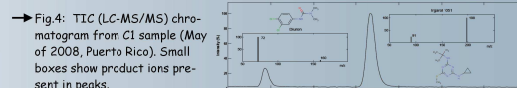
↑ Fig. 1: Location and sample points monitoring from May of 2008 to May of 2009.



↑ Fig. 2: Concentration levels (ng/l) of Diuron (left) and Irgarol 1051 (right) grouped by Harbour.



← Fig. 3: Mean Concentrations levels (ng/l) of Diuron and Irgarol 1051 by harbour and month.  
\*MPC: Maximum Permissible Concentration. Dutch authorities [3].

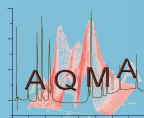


### References:

- [1] Manzo S., S. Buono and C. Cremisini. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 2006, 51, 61.
- [2] Sánchez Rodríguez Á., Z. Sosa Ferrera and J.J. Santana Rodríguez. Environ. Chem. Lett. (submitted)
- [3] Lamoree M. H., C.P. Swart, A. van der Horst and B. van Hattum. J. Chromatogr. A. 2002, 970, 183.

Acknowledgements: This work was supported by funds provided by Spanish Ministry of Education and Science. Project N°: CTM2006/06503

Figura B.6 .- HPLC 2009.



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

## OPTIMIZATION OF A SIMPLE METHOD FOR THE DETERMINATION OF COMMON BOOSTER BIOCIDES IN MARINE SEDIMENTS BY MEANS OF MAE AND LC-MS/MS

Álvaro Sánchez Rodríguez, Zoraida Sosa Ferrera, José J. Santana Rodríguez

Department of Chemistry, Faculty of Marine Sciences, University of Las Palmas de G.C., 35017

Las Palmas de G.C. Spain, e-mail: [jsantana@dqui.ulpgc.es](mailto:jsantana@dqui.ulpgc.es)

Website: [www.gi.ulpgc.es/aqma](http://www.gi.ulpgc.es/aqma)

### INTRODUCTION

From seventies to our days organotin compounds has been commonly employed as biocides in antifouling paints added to ship hulls. Due their toxic effects they have been forbidden in EU [1]. In order to replace them, other biocides were introduced. They are known as booster biocides and are added to improve the efficiency of antifouling paints based in copper oxides. Booster biocides are also high toxic to non target species [2].

Commonly used methods for the extraction and preconcentration of these analytes from marine sediments are often too time consuming, involve multi-step procedures and prone to loss of analytes. Modern trends in analytical chemistry are developed towards the simplification of sample preparation, reducing analysis time and improve the quality and sensitivity.

In this work, a method combining microwave assisted extraction (MAE) followed by solid phase extraction (SPE) step for clean-up and preconcentration, is optimized before the chromatographic determination by LC-MS/MS of four common booster biocides (Diuron, TCMTB, Irgarol 1051 and Dichlofluand) in marine sediments.

### Apparatus.-

- HPLC/UV system.- employed to the optimization of MAE extraction.
- LC-MS/MS (Triple quadrupole) with ESI.- employed with identification and quantification objectives in real samples.
- Microwave

### MAE-SPE procedure.-

The surrogate material (Diuron-d<sub>6</sub>) was added to 1 g of sample. The extraction was carried out with methanol under optimized values of time and power. The extract was filtered with a 45 µm pore size nylon filter and was mixed with 100 mL of ultra-pure water. Then a SPE step (Table 1), previously studied [3], was applied to clean up and to preconcentrate.

### EXPERIMENTAL

### MAE OPTIMIZATION

#### Variables under study.-

Solvent volume  
Power  
Time

#### 1° Step: factorial design (2<sup>3</sup>).- Time x Power (the largest effect)

#### 2° Step: Response surface design (3<sup>2</sup>) (See Figure 1)

#### Optimum values.-

Methanol volume: 10 mL  
Power: 200 W  
Time: 6 min.

### REAL SAMPLES

Finally the optimized method was employed to determine the booster biocides in real samples coming from marinas of Gran Canaria island-NW Africa (Spain). See Table 3.

Cartridge	Envirelut Pesticide Varian (6 mL, 500 mg)
Sample Volume	100 mL water + 10mL of MAE extract (methanol)
Wash step	2x5mL (water)
Elution volume	1 mL (methanol)

Table 1.- SPE parameters employed to preconcentration and clean up step.

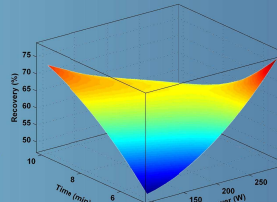


Figure 1.- Response surface to time x power optimization of TCMTB.



Figure 2.- Total ion current (TIC) chromatogram of a spiked sample (10 ng/g).



Figure 3.- Marinas under study around Gran Canaria island (see results in Table 3). A. Las Palmas de Gran Canaria: Club Náutico (A1 and A2) and Muelle Deportivo (A3), B. Mogán (B1 and B2), C. Puerto Rico and D. Arguineguín.

Sample	Diuron (ng/g)	Irgarol 1051 (ng/g)	Dichlofluand (ng/g)
A1	<L.O.D.	<L.O.D.	<L.O.D.
A2	<L.O.D.	<L.O.D.	<L.O.D.
A3	<L.O.D.	<L.O.D.	3,8
B1	<L.O.D.	<L.O.D.	<L.O.D.
B2	<L.O.D.	<L.O.D.	<L.O.D.
C	<L.O.D.	<L.O.D.	3,7
D	5,3	23,9	16,6

Table 2.- Analytical parameters to MAE-SPE extraction LC-MS/MS determination.

Table 3.- Levels (ng/g) of booster biocides from marine sediments collected in marinas of Gran Canaria island (May 2009).

Compound	Level= 10 ng/g (n=6)		Level=100 ng/g (n=6)		L.O.D. (ng/g)
	Recovery (%)	R.S.D. (%)	Recovery (%)	R.S.D. (%)	
Diuron	99,7	5,4	92,9	5,1	0,2
TCMTB	79,3	3,3	78,1	3,3	0,3
Irgarol 1051	84,3	4,9	91,1	2,5	0,1
Dichlofluand	76,1	6,5	76,2	4,4	0,3

### CONCLUSIONS

A MAE-SPE extraction coupled to LC-MS/MS determination was developed to determine common booster biocides in marine sediments. Suitable recoveries (> 75%), good relative standard deviations (< 10 %) and low limits of detection were obtained. By means of application of method to real samples, it was possible measured Diuron, Irgarol 1051 and Dichlofluand in sediments from several marinas of Gran Canaria island.

### References.-

- [1] CE, European Directive 782/2003.
- [2] Manzo S., S. Buono and C. Cremisini. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 2006, 51, 61.
- [3] A. Sánchez Rodríguez, Z. Sosa Ferrera and J.J. Santana Rodríguez. Environ. Chem. Lett. (submitted).

Acknowledgements: This work was supported by funds provided by Spanish Ministry of Education and Science Project N°: CTM2006/06503

Figura B.7.- Euroanalysis 2009.