

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



**DESARROLLO DE METODOLOGÍA ANALÍTICA
PARA LA DETERMINACIÓN DE
TENSIOACTIVOS Y SUS PRODUCTOS DE
DEGRADACIÓN MEDIANTE DIFERENTES
TÉCNICAS SEPARATIVAS**

TESIS DOCTORAL

INMACULADA JIMÉNEZ DÍAZ

GRANADA, 2009

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Inmaculada Jiménez Díaz
D.L.: GR. 2013-2009
ISBN: 978-84-692-2245-4

**DESARROLLO DE METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA
DETERMINACIÓN DE TENSIOACTIVOS Y SUS
PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN MEDIANTE
DIFERENTES TÉCNICAS SEPARATIVAS**

por

INMACULADA JIMÉNEZ DÍAZ

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA
UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**MEMORIA presentada para aspirar
al Grado de Doctor en Química por
la Universidad de Granada.**

Fdo. Dr. Alberto Navalón Montón
Profesor Titular del Departamento de
Química Analítica de la Universidad de
Granada

**VISADA en Granada a 27 de
Febrero de 2009**

Fdo. Dr. Oscar Ballesteros García
Profesor Ayudante Doctor del
Departamento de Química Analítica de
la Universidad de Granada

Fdo. Inmaculada Jiménez Díaz
Licenciada en Química

Fdo. Dr. Alberto Zafra Gómez
Doctor en Ciencias Químicas por la
Universidad de Granada

ÍNDICE

OBJETO DE LA TESIS	1
ACRÓNIMOS	5
CAPÍTULO 1 - INTRODUCCIÓN	13
1 - DESARROLLO HISTÓRICO, CLASIFICACIÓN Y CONSTITUCIÓN DE SUSTANCIAS CON CARÁCTER TENSOACTIVO	15
1.1 - Desarrollo histórico	15
1.2 - Clasificación.....	24
1.3 - Constitución de los detergentes: Tensioactivos y Compuestos complementarios	30
2 - SULFONATO DE ALQUIBENCENO LINEAL (LAS), ALQUILFENOLES ETOXILADOS (APEO) Y ALCOHOLES ETOXILADOS (AEO). SÍNTESIS. VENTAJAS E INCONVENIENTES	32
2.1 - Sulfonato de Alquilbenceno Lineal	32
2.2 - Alquilfenoles etoxilados.....	34
2.3 - Alcoholes etoxilados	36
3 - PROPIEDADES Y APLICACIONES DE LOS TENSOACTIVOS.....	38
4 - IMPLICACIONES AMBIENTALES. ACTIVIDAD MEDIAMBIENTAL	45
5 - BIODEGRADACIÓN. CONCEPTO Y EVALUACIÓN	52
5.1. Métodos analíticos para el seguimiento de la biodegradación.....	56
5.2. Modelos matemáticos.....	57
5.3. Rutas de biodegradación.....	61
5.3.1. Sulfonatos de alquilbenceno lineales	62
5.3.2. Alquilfenoles etoxilados.....	65
5.3.3. Alcoholes etoxilados	68
5.4. Relación entre estructura y biodegradabilidad.....	71
5.4.1. Sulfonatos de alquilbenceno lineales	71
5.4.2. Alquilfenoles etoxilados.....	73

5.4.3. Alcoholes etoxilados	74
6 - LEGISLACIÓN.....	77
7 - MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS SULFOFENILCARBOXÍLICOS, ALQUILFENOLES Y ALQUILFENOLES ETOXILADOS Y ALCOHOLES ETOXILADOS	81
7.1 - Ácidos sulfofenilcarboxílicos	81
7.2 - Alquilfenoles etoxilados y alquilfenoles.....	84
7.2.1 - Espectrometría de absorción molecular UV-vis (colorimetría).....	84
7.2.2 - Espectrometría IR y RMV	86
7.2.3 - Cromatografía de líquidos.....	87
7.2.4 - Cromatografía de gases.....	93
7.2.5 - Cromatografía de fluidos supercríticos	98
7.2.6 - Electroforesis capilar	98
7.3 - Alcoholes etoxilados	99
7.3.1 - Espectrometría de absorción molecular UV-vis (colorimetría).....	99
7.3.2 - Espectrometría IR y RMN	100
7.3.3 - Cromatografía de líquidos.....	100
7.3.4 - Cromatografía de gases.....	103
7.3.5 - Cromatografía de fluidos supercríticos	104
7.3.6 - Electroforesis capilar	105
8 - TRATAMIENTO DE MUESTRAS	107
8.1 - Extracción con disolventes presurizados	114
8.1.1 - Pretratamiento de la muestra.....	117
8.1.2 - Optimización del procedimiento de extracción.....	118
8.1.3 - Lavado y enriquecimiento del extracto	122
8.1.4 - Aplicaciones analíticas	125
8.2 - Otras técnicas de extracción	130
8.2.1 - Extracción soxhlet convencional	130
8.2.2 - Extracción con ultrasonidos	130
8.2.3 - Extracción asistida con fluidos supercríticos	133
8.2.4 - Extracción asistida con microondas	134
8.3 - Extracción en fase sólida	135

8.3.1 - Fundamento de la extracción en fase sólida.....	136
8.3.2 - Tipos de adsorbentes.....	139
9 - LA VEGA DE GRANADA	148
9.1. Antecedentes históricos	148
9.2. Características físicas y socioeconómicas de la Vega de Granada.....	149
9.3. Calidad de las aguas subterráneas en la Vega de Granada.....	150
CAPÍTULO 2 - EXPERIMENTAL: MATERIALES Y MÉTODOS	155
1 - INTRODUCCIÓN.....	157
2 - DISOLUCIONES, REACTIVOS Y DISOLVENTES EMPLEADOS	158
2.1 - Disoluciones	158
2.2 - Reactivos	160
2.3 - Disolventes	162
3 - MATERIAL DE LABORATORIO E INSTRUMENTACIÓN	163
3.1 - Material de laboratorio.....	163
3.2 - Instrumentación	165
3.2.1 - Electroforesis capilar.....	165
3.2.2 - Cromatógrafo de líquidos	166
3.2.3 - Cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas	166
3.2.4 - Equipo de extracción con disolventes presurizados	167
3.2.5 - Equipo para extracción en fase sólida.....	168
3.2.6 - Otros aparatos e instrumentos.....	169
4 - PROGRAMAS INFORMÁTICOS.....	171
5 - CALIBRACIÓN Y PARÁMETROS ANALÍTICOS DEL MÉTODO	172
6.1 - Rechazo de valores anómalos.....	175
6.2 - Función de calibración	176
6.3 - Parámetros de calidad del método analítico.....	178
5.3.1 - Rango dinámico lineal y linealidad.....	179

5.3.2 - Precisión	180
5.3.3 - Sensibilidad o resolución analítica	181
5.3.4 - Límite de cuantificación y detección	182
6 - VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.....	192
6.1 - Ensayos de recuperación.....	192
6.2 - Metodología de adición de patrón	193
CAPÍTULO 3 - DETERMINACIÓN DE SPCs EN MUESTRAS ACUOSAS	199
1 - SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS ÁCIDOS SULFONILCARBOXÍLICOS.....	202
1.1 - Procedimiento operatorio para la síntesis de SPCs	204
1.2 - Caracterización de los SPCs sintetizados	206
1.2.1 - Resonancia Magnética Nuclear de ¹³ C y ¹ H.....	206
1.2.2 - Espectroscopía de IR	211
1.2.3 - Espectrometría de masas.....	213
1.3 - Rendimiento de la reacción de síntesis.....	216
2 - DESARROLLO DE METODOLOGÍA ANALÍTICA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CON DETECCIÓN FLUORESCENTE PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS SPCs EN MUESTRAS ACUOSAS	217
2.1 - Optimización de las variables implicadas en el procedimiento cromatográfico.....	217
2.1.1 - Selección de la fase estacionaria	217
2.1.2 - Estudio de la composición de la fase móvil	220
2.1.2.1 - Estudio del comportamiento de diferentes tampones sobre la resolución de los SPCs	220
2.1.2.2 - Estudio del pH de la fase móvil	222
2.1.2.3 - Optimización del gradiente de composición de la fase móvil	223
2.1.3 - Estudio de las longitudes de onda de medida.....	224
2.1.4 - Influencia de la ganancia del tubo fotomultiplicador	225
2.1.5 - Influencia de la temperatura de la columna.....	227

2.1.6 - Influencia del volumen de inyección	228
2.1.7 - Resumen de las condiciones óptimas de trabajo.....	
2.2 - Optimización de las variables implicadas en la SPE.....	
2.2.1 - Selección del tipo de adsorbente.....	
2.2.2 - Procedimiento SPE con adsorbentes de SAX.....	
2.2.3 - Procedimiento SPE con adsorbentes de ENV+	
2.2.4 - Selección del procedimiento de SPE.....	
2.2.5 - Procedimiento operatorio para la SPE	
2.3 - Parámetros analíticos del método cromatográfico	
2.3.1 - Establecimiento y verificación del modelo	
2.3.2 - Parámetros de calidad del método analítico	
2.3.2.1 - Límite de detección y cuantificación.....	
2.3.2.2 - Rango dinámico lineal y Linealidad	
2.3.2.3 - Precisión	
2.3.2.4 - Sensibilidad o Resolución analítica.....	
2.4 - Validación del método cromatográfico desarrollado.....	
3 - DESARROLLO DE METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE SPCs MEDIANTE CE-DAD.....	
3.1 - Factores que afectan a la separación electroforética	
3.1.1 - Factores relacionados con la dispersión.....	
3.1.2 - Factores relacionados con el medio electroforético.....	
3.1.3 - Factores operacionales	
3.2 - Condiciones experimentales preliminares	
3.3 - Optimización de las variables experimentales implicadas en el proceso electroforético.....	
3.3.1 - Influencia del pH.....	
3.3.2 - Influencia de la naturaleza y concentración de la disolución reguladora	
3.3.3 - Influencia de la adición de modificadores orgánicos.....	
3.3.4 - Influencia de la concentración de CTAB	
3.3.5 - Influencia del voltaje.....	
3.3.6 - Influencia de la temperatura	
3.4 - Procedimientos de preconcentración	
3.4.1 - Preconcentración on-line	

3.4.2 - Preconcentración off-line	
3.5 - Resumen de las condiciones óptimas de trabajo	
3.6 - Parámetros analíticos del método electroforético	
3.6.1 - Establecimiento y verificación del modelo	
3.6.2 - Parámetros de calidad del método analítico	
3.6.2.1 - Límite de detección y cuantificación	
3.6.2.2 - Rango dinámico lineal y Linealidad	
3.6.2.3 - Precisión	
3.6.2.4 - Sensibilidad o Resolución analítica	
3.6.3 - Validación del método electroforético desarrollado	
4 - APLICACIÓN DE LA METODOLOGÍA DESARROLLADA	
4.1 - Estudio previo de adsorción de SPCs en columna	
4.2 - Características del suelo y agua empleadas en el estudio	
4.2.1 - Estudio del suelo	
4.2.1.1 - Propiedades físicas del suelo	
4.2.1.2 - Propiedades químicas del suelo	
4.2.2 - Estudio del agua de pozo empleada	
4.3 - Experiencia de campo	
4.3.1 - Descripción de la parcela experimental	
4.3.2 - Puesta a punto de la metodología de toma de muestras de agua	
4.3.3 - Resultados	

CAPÍTULO 4 - DETERMINACIÓN DE APEO y AP EN MUESTRAS DE SUELO

1 - DESARROLLO DE METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE APEO Y AP EN MUESTRAS DE SUELO MEDIANTE LC-FLD	
1.1 - Optimización de las variables implicadas en el proceso cromatográfico	
1.1.1 - Selección de la fase estacionaria	
1.1.2 - Optimización de la proporción THF:H ₂ O en la fase móvil	
1.1.3 - Influencia del volumen de inyección	
1.1.4 - Influencia de la temperatura de la columna	
1.1.5 - Resumen de las condiciones óptimas de trabajo	

1.2 - Caracterización de las mezclas Igepal CA-210 e Igepal CA-520	
1.3 - Optimización de las variables implicadas en el procedimiento SPE.....	
1.3.1 - Selección del tipo de adsorbente.....	
1.3.2 - Optimización de las etapas de carga y acondicionamiento	
1.3.3 - Optimización de la etapa de lavado	
1.3.4 - Optimización de la etapa de secado	
1.3.5 - Selección del volumen de elución.....	
1.3.6 - Resumen de las condiciones óptimas del procedimiento SPE	
1.4 - Optimización de las variables del procedimiento PLE	
1.4.1 - Selección del disolvente de extracción	
1.4.2 - Optimización de la temperatura de extracción.....	
1.4.3 - Optimización del tiempo de extracción.....	
1.4.4 - Selección del número de ciclos.....	
1.4.5 - Influencia del secado del suelo en estufa y la adición de sustancias desecantes	
1.4.6 - Resumen de las condiciones óptimas del procedimiento PLE	
1.5 - Procedimiento operatorio para el tratamiento de muestras	
1.6 - Parámetros analíticos del método cromatográfico	
1.6.1 - Establecimiento y verificación del modelo	
1.6.2 - Parámetros de calidad del método analítico	
1.6.2.1 - Límite de cuantificación y detección	
1.6.2.2 - Rango dinámico lineal y Linealidad	
1.6.2.3 - Precisión	
1.6.2.4 - Sensibilidad o Resolución analítica.....	
1.6.3 - Validación del método cromatográfico desarrollado	
2 - DESARROLLO DE METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE APEO Y AP EN MUESTRAS DE SUELO MEDIANTE GC-MS	
2.1 - Parámetros instrumentales del espectrómetro de masas	
2.1.1 - Análisis en modo SCAN.....	
2.1.2 - Análisis en modo SIM (Selected Ion Monitoring)	
2.2 - Derivatización de compuestos hidroxilados. Silanización.....	
2.3 - Caracterización de los compuestos mediante GC-MS	
2.4 - Optimización de la reacción de derivatización	

2.4.1 - Influencia del tiempo de reacción	
2.4.2 - Influencia de la temperatura de reacción.....	
2.4.3 - Influencia del porcentaje de BSTFA.....	
2.5 - Procedimiento operatorio para el tratamiento de muestras	
2.6 - Parámetros analíticos del método cromatográfico	
2.6.1 - Establecimiento y verificación del modelo	
2.6.2 - Parámetros de calidad del método analítico	
2.6.2.1 - Límite de detección y cuantificación.....	
2.6.2.2 - Rango dinámico lineal y Linealidad	
2.6.2.3 - Precisión	
2.6.2.4 - Sensibilidad o Resolución analítica.....	
2.6.3 - Validación del método cromatográfico desarrollado	
3 - APLICACIÓN DE LA METODOLOGÍA DESARROLLADA	
3.1 - Determinación de APEO y AP en suelo de la Vega de Granada	
3.2 - Experiencia de campo.....	
CAPÍTULO 5 - DETERMINACIÓN DE AEO EN MUESTRAS DE SUELO.....	
1 - DESARROLLO DE METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE AEO MEDIANTE GC-MS	
1.1 - Caracterización de los compuestos mediante GC-MS	
1.2 - Optimización de la reacción de derivatización	
1.2.1 - Influencia del tiempo de reacción	
1.2.2 - Influencia de la temperatura de reacción	
1.2.3 - Influencia del porcentaje de BSTFA.....	
1.3 - Selección del procedimiento de extracción en fase sólida	
1.4 - Optimización de las variables implicadas en el procedimiento PLE	
1.4.1 - Optimización de la temperatura de extracción	
1.4.2 - Optimización del tiempo de extracción.....	
1.4.3 - Selección del número de ciclos.....	
1.4.4 - Resumen de las condiciones óptimas del procedimiento PLE	
1.5 - Procedimiento operatorio para el tratamiento de muestras	
1.6 - Parámetro de calidad del método.....	

1.6.1 - Establecimiento y verificación del modelo	
1.6.2 - Parámetros de calidad del método analítico	
1.6.2.1 - Límite de detección y cuantificación	
1.6.2.2 - Rango dinámico lineal y Linealidad	
1.6.2.3 - Precisión	
1.6.2.4 - Sensibilidad o Resolución analítica	
1.6.3 - Validación del método cromatográfico desarrollado	
2 - APLICACIÓN DE LA METODOLOGÍA DESARROLLADA	
2.1 - Determinación de AEO en suelo de la Vega de Granada	
CONCLUSIONES	479
ARTICULOS	487

OBJETO DE LA TESIS

En las últimas décadas, el comportamiento de los contaminantes químicos en el medio ambiente se ha convertido en un tema extremadamente importante. Por ello se han desarrollado numerosos métodos para la investigación y vigilancia de un elevado número de compuestos, entre ellos los tensioactivos.

El gran volumen de fabricación de tensioactivos, debido a su amplio uso tanto a nivel doméstico como industrial, justifica cualquier estudio de impacto ambiental que se realice sobre ellos.

El objetivo de esta Memoria es el desarrollo de metodología analítica de buenas características (sensibilidad y selectividad) para la identificación y determinación de distintos tensioactivos (alquilfenoles etoxilados y alcoholes etoxilados) y productos de degradación de tensioactivos (ácidos sulfonilcarboxílicos, alquilfenoles y alquilfenoles mono- y di-etoxilados) en distintas muestras ambientales.

Para ello, atendiendo a las propiedades analíticas de los compuestos objeto de estudio, se han seleccionado las técnicas analíticas separativas de cromatografía de líquidos con detección fluorescente, electroforesis capilar con detección con Diodos Array y cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas, siempre llevando a cabo los oportunos tratamientos previos de muestra.

ACRÓNIMOS

ACN	Acetonitrilo
AcOH	Ácido acético
AEO	Alcoholes etoxilados
AES	Alcoholes etoxisulfatos
ANOVA	Análisis de varianza
ANEO	Alquilaminas etoxiladas
AP	Alquilfenoles
APCI	Ionización química a presión atmosférica
APEO	Alquilfenoles etoxilados
AS	Alcoholes sulfatos
BAB	Alquilbenceno ramificado
BABS	Sulfonato de alquilbenceno ramificado
BPA	Bisfenol-A
BSA	N,O-bis(trimetilsilil) acetamida
BSTFA	N,O-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida
CE	Electroforesis capilar
CMC	Concentración micelar crítica
CI	Ionización química
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio
CTAS	Sustancias activas al tiocianato de cobalto
C_nEO_m	Alcohol etoxilado con una cadena carbonada de n carbonos y m unidades etoxiladas
DAD	Detector diodo array
DBO	Demanda biológica de oxígeno

DCM	Diclorometano
DEE	Dietiléter
DER	Desviación estándar relativa
DQO	Demanda química de oxígeno
EAD	Detector de emisión atómica
ECD	Detector de captura de electrones
EDAR	Estación Depuradora de Aguas Residuales
EG	Etilen glicol
EI	Ionización electrónica
EO	Unidad etoxilada
ENV +	Adsorbente para <i>SPE</i> (polímero depoliestireno-divilbenceno)
ESI	Ionización con electroespray
FD	Detector de fluorescencia
FEO	Flujo electroosmótico
FID	Detector de ionización de llama
FM	Fotomultiplicador
FTIR	Espectroscopía infraroja por transformada de Fourier
GC	Cromatografía de Gases
GBC	Adsorbente para <i>SPE</i> (carbón grafitizado desactivado)
HERA	Human and environmental risk assessment
HLB	Adsorbente para <i>SPE</i> (copolímero)
HMDS	Hexametildisilizano
HT-GC	Cromatografía de gases de alta temperatura

$h_{0.5}$	Mitad de la altura del pico gaussiano
IPA	2-propanol (Isopropanol)
IR	Infrarojos
K_d	Constante de adsorción suelo-agua
K_f	Constante de adsorción de Freundlich
K_{oc}	Constante de adsorción normalizada respecto al contenido de carbono orgánico
LAB	Alquilbenceno lineal
LAS	Sulfonato de alquilbenceno lineal
LC	Cromatografía líquida
LC_{50}	Concentración que resulta letal para el 50% de los organismos expuestos durante un periodo especificaco, normalmente 96 horas
LD	Límite de Detección
LIN	Linealidad
LLE	Extracción líquido-líquido
LQ	Límite de cuantificación
MAE	Extracción asistida con microondas
MeOH	Metanol
MO	Materia orgánica
MS	Detector de espectrometría de masas
MSA	N-metil-N-trimetilsilil acetamica
MSTFA	N-metil-N-trimetilsilil trifluoroacetamida
MTBE	Metilterbutiléter
m/z	Relación masa/carga
RMN	Resonancia magnética nuclear

NP	Nonifenol
NPEC	Nonilfenol etoxicarboxilado
NP_xEO	Nonifenol con x unidades etoxiladas
NSM	Stacking en modo normal
N_T	Nitrógeno total
OP	Octilfenol
OPE_xO	Octilfenol con x unidades etoxiladas
O/W	Emulsión aceite en agua
P	Parámetro de resolución
PAHs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
P_c	Presión crítica
PCBs	Policloro bifenilos
PCDDs	Dibenzodioxinas policloradas
PCDFs	Dibenzofuranos policlorados
PEC	Concentración previsible en el medio ambiente
PFBBr	Bromuro de pentafluorobenzoilo
PFBCl	Cloruro de pentafluorobenzoilo
PLE	Extracción con líquidos presurizados
PNEC	Concentración máxima esperada que no produzca ningún efecto
PI	Patrón interno
PS-DVB	Adsorbente para <i>SPE</i> (poliestireno-divilbenceno)
PVC	Cloruro de polivinilo
PVDF	Difluoruro de Polivinilidina

py	piridina
RDL	Rango dinámico lineal
RDX	Adsorbente para <i>SPE</i> (polímero de divilbenceno-vinilpirrolidona)
RP	Fase inversa
rpm	Revoluciones por minuto
R_s	Resolución
SAX	Adsorbente para <i>SPE</i> (amina cuaternaria-intercambio aniónico)
SCX	Adsorbente para <i>SPE</i> (intercambio catiónico)
SDS	Dodecilsulfato de sodio
Sep-Pak plus PS-2	Adsorbente para <i>SPE</i> (polímero de poliestireno-divilbenceno)
SFC	Cromatografía de fluidos supercríticos
SFE	Extracción por fluido supercrítico
SPC	Ácido sulfofenil carboxílico
SPE	Extracción en fase sólida
SPME	Microextracción en fase sólida
SIM	Monitoración del ión seleccionado
SWE	Extracción con agua presurizada
S_{analítica}	Sensibilidad o Resolución analítica
S_{y/x}	Desviación estándar de la regresión
TCS	Triclorosilano
THF	Tetrahidrofurano
TMA	Tetrametilamonio hidrogeno sulfato
TMCS	Trimetil clorosilano

TMSDEA	N-trimetilsilil dietilamina
TMSDMA	N-trimetilsilil dimetilamina
TMSI	N-trimetilsilil imidazol
TPHs	Hidrocarburos de petróleo totales
T_c	Temperatura crítica
UV	Ultravioleta
Vis	visible
W_b	Anchura de la base del pico cromatográfico
W/O	Emulsión agua en aceite
W_{0.5h}	Anchura a mitad de altura del pico cromatográfico
XAD-resinas	Resinas poliméricas de amberlita usadas para la <i>SPE</i>
Ø	Radical fenilo
λ	Longitud de onda
θ	Porosidad del suelo
ρ	Densidad del medio
1/n	Exponente de Freundlich

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.- DESARROLLO HISTÓRICO, CLASIFICACIÓN, CONSTITUCIÓN DE SUSTANCIAS CON CARÁCTER TENSIOACTIVO

1.1 - Desarrollo histórico

La limpieza es una actividad común a todos los seres vivos. En el caso de la especie humana ha evolucionado con el transcurso del tiempo permaneciendo unida y caracterizando a las diversas culturas y civilizaciones que han buscado aditivos que mejorasen la capacidad limpiadora del agua. Así, en el antiguo Egipto el símbolo que representaba la acción de lavar consistía en una figura humana con los pies sumergidos en agua, siendo éste por tanto el único agente de lavado conocido. Posteriormente se observó que se podía mejorar el rendimiento del lavado utilizando agua de lluvia, agua caliente o utilizando aditivos como el carbonato sódico (sosa).

El jabón ha sido el agente de lavado más usado por la humanidad aunque fue empleado durante mucho tiempo únicamente como cosmético (principalmente para decolorar el cabello y como remedio casero).

El origen del jabón, definido como sal alcalina de un ácido graso, se sitúa indudablemente mucho antes de la Era Cristiana. Ya se comentaba su fabricación en una tablilla Sumeria 3000 años a.C., donde se describían las propiedades curativas de un “azufre jabonoso”. En Tello, Mesopotamia, se ha encontrado una lasca de arcilla del año 2500 a.C. en la que se relata la fabricación del jabón, utilizando para ello aceite y la cantidad precisa de hierba jabonosa. En un papiro egipcio, aproximadamente del año 1500 a.C., y que constituye todo un tratado

médico, se indica que, mezclando aceites animales y vegetales con ciertas sales (que debían ser alcalinas), se obtenía un producto de tipo jabonoso útil para combatir enfermedades de la piel y también para el lavado.

Existen referencias bíblicas acerca de ciertos productos líquidos alcalinos que poseían propiedades limpiadoras. Las sustancias constituyentes de los jabones, en general, eran obtenidas a partir del tratamiento de aceites o grasas (ésteres) con hidróxidos de metales alcalinos¹. Las tribus germánicas de la época de César hervían sebo de cabra con potasa, que obtenían por lixiviación de las cenizas del fuego de leña, efectuaban la misma reacción química realizada por los fabricantes de jabón modernos a una escala industrial: la hidrólisis de los glicéridos.

El sabio romano Plinio el Viejo (23 - 79 d.C.), autor de la célebre “Historia Natural”, menciona la preparación de jabón a partir del cocimiento del sebo de carnero con cenizas de madera y, de acuerdo con su descripción, este procedimiento involucra el tratamiento repetido de esta pasta con sal, hasta obtener el producto final. Según él, los fenicios ya conocían esta técnica desde el año 600 a.C. En las ruinas de Pompeya, ciudad destruida aproximadamente en el año 79 d.C. por la explosión del Vesubio, los arqueólogos desenterraron una fábrica de jabón. Al parecer, los romanos no lo empleaban para la limpieza, ya que la mayor parte se mezclaba con aromatizantes para cabellos y cosméticos o era adicionado a los empastes utilizados en el tratamiento

¹ Waite T.D., *Principles of Water Quality*. Academic Press Inc, New York, USA, pp. 86-91, 1984.

de quemaduras y heridas. Eventualmente se empleaba con finalidades de limpieza al lavarse el cuerpo de personas homenajeadas.

El médico griego Galeno (130 - 200 d.C.), que logró fama y fortuna en Roma, en su obra “*De simplicibus medicaminibus*”, describe una técnica según la cual el jabón podía ser preparado con grasas y cenizas, enfatizando su utilidad como medicamento para la eliminación de suciedad corporal y de tejidos muertos en la piel. El alquimista árabe Geber (Jabir Ibn Hayyan), en manuscritos del siglo VIII, también menciona el jabón como agente de limpieza. También a los árabes se les atribuye la sustitución de las cenizas por la cal viva, permitiendo la elaboración de jabones más eficientes.

En España, los musulmanes preparaban jabones a partir de aceite de oliva, sin embargo, fue en ciudades costeras del Mediterráneo como Marsella, Génova, Venecia y otras, donde se desarrolló una importante industria jabonera gracias a la abundancia del aceite de oliva. A partir de ahí hubo dos grandes avances químicos que marcaron una revolución en la producción de jabones: I) En 1791, el médico cirujano francés y aficionado a la química Nicolás Leblanc, concluyó el desarrollo de un método de obtención de carbonato sódico a partir de cloruro sódico (sal común), hecho por el cual Leblanc es considerado por la comunidad científica como el fundador de la Química Industrial; II) Entre 1813 y 1823, el químico francés Michel-Eugène Chevreul, profundizó sobre la composición química de las grasas naturales y demostró que su formación era debida a una reacción química, de modo que los fabricantes del siglo XIX pudieron tener una idea del proceso químico involucrado y disponer de la materia prima necesaria para su fabricación.

Más adelante el método Leblanc para la obtención de carbonato sódico fue sustituido por el método de Ernest Solvay, un químico industrial belga, adquiriendo su primera patente para la producción de carbonato sódico en 1861. En ella se utilizaba como materias primas cloruro sódico, amoníaco y carbonato cálcico (piedra caliza), consiguiendo abaratar aún más el proceso y eliminar algunos de los problemas que presentaba el método Leblanc.

Durante los siglos XVIII y XIX, la industria de los jabones sufrió un extraordinario desarrollo, ampliando la oferta a productos con distintas formas y variedades como: jabones duros, blandos, perfumados, etc. Debido a estos avances en la tecnología de fabricación con reducción de sus costes, hubo una mayor producción y consumo de estos productos, ocasionando una mejora en la higiene personal y, consecuentemente, contribuyendo al crecimiento exponencial de la población europea por disminución de las causas de mortalidad.

En 1878, en Alemania, se elaboró un producto que además de contener jabón como uno de sus componentes, se complementaba con una innovación: la adición de silicato sódico (como recurso para reducir la dureza del agua, que disminuía el poder de detergencia de los jabones). Así, este producto denominado *Henkel's "Bleichsoda"*, puede ser considerado como la primera formulación comercial. Este "ablandamiento" del agua se obtenía gracias a la precipitación de las sales de calcio y magnesio así como las de hierro, responsables de la tendencia a amarillear la ropa.

Durante la Primera Guerra Mundial, como la obtención de las grasas era difícil en Alemania, ya que se utilizaban con fines nutritivos, los

científicos empezaron a estudiar la posibilidad de desarrollar tensioactivos sintéticos para sustituir al jabón y así el químico Fritz Günther logró sintetizar el primer jabón artificial en el año 1916. Se trataba del compuesto diisopropilnaftaleno sulfonato sódico, que presentaba mejores características que los jabones naturales, sin embargo, las cadenas cortas no conseguían el suficiente carácter tensioactivo. En seguida, surgieron los sulfatos de alcoholes grasos, descubiertos por Bertsch y colaboradores en 1928. En 1932, se comercializó el primer detergente para uso doméstico en los Estados Unidos de América, que fue desarrollado como respuesta a la necesidad de obtener un sustituto de los jabones en las zonas del país que presentaban alta dureza en el agua y por las noticias que llegaban de Alemania anunciando el descubrimiento de un tensioactivo artificial. Estos dos factores estimularon el desarrollo de la industria estadounidense de detergentes.

También en 1932, la empresa *Henkel* en Alemania comercializó alcoholes grasos como el oleico ($C_{18:1}$) y el esteárico ($C_{18:0}$) procedentes del aceite del esperma de ballena, extendiendo esta comercialización a los alcoholes grasos como el laúrico y mirístico ($C_{12:0}$ y $C_{14:0}$, respectivamente) por presentar mejores propiedades.

Un paso importante en el desarrollo de los tensioactivos fue la introducción de máquinas automáticas de lavado. El cambio en las costumbres domésticas condujo a la necesidad de sustituir gradualmente el jabón, muy sensible a la dureza del agua, por otros tensioactivos, de origen sintético, con características más apropiadas. Esta situación, junto a los relevantes progresos logrados por la humanidad gracias a la Medicina, la Química y en gran medida a los hábitos higiénicos, condujo

en los años 50 al desarrollo de nuevos productos de origen sintético con propiedades deterativas, basados en el alquilbenceno ramificado (BAB, del inglés **B**ranch**e**d **A**lky**l**benz**e**ne).

En la siguiente figura se pueden observar los resultados referentes a la evolución de ventas tanto de jabones como de tensioactivos sintéticos. Se evidencia un enorme aumento en la producción de los tensioactivos sintéticos. Estos datos proceden de la “*American Soap and Detergent Association*” y de la “*Henkel & Cie*”, desde 1940 a 1972²:

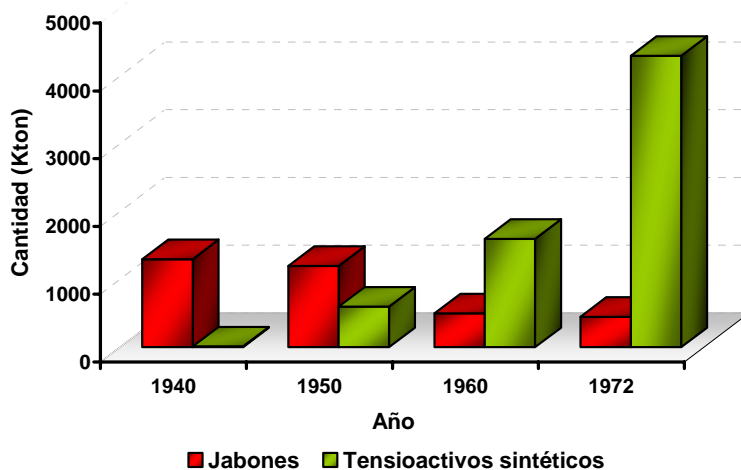


Figura 1.1 - Evolución de la venta de jabones y tensioactivos sintéticos

Basados en estos valores, se verifica que inmediatamente después de la Segunda Guerra Mundial, se produjo un aumento notable en la fabricación de tensioactivos sintéticos frente a la de jabones naturales, presentando estos últimos una tendencia de fabricación inicialmente constante, aunque a partir de los años 60 experimentó un brusco descenso, permaneciendo prácticamente constante hasta nuestros días.

² KIWI Web: www.chemistry.co.nz/surfactants.htm

El alquilbenceno ramificado una vez sulfonado originaba el sulfonato de alquilbenceno ramificado (BABS, del inglés **B**ranch**e**d **A**lky**l**benz**e**n**e** **S**ulphonate). Este producto ya satisfacía la demanda del 60% del mercado mundial en 1950, pues presentaba unas propiedades deterativas muy buenas, aunque no exhibía un adecuado comportamiento en el medio ambiente. Se comprobó que esto era debido a su falta de biodegradación y por ello es considerado como un "alquilato duro" o no biodegradable.

Este problema propició el desarrollo del alquilbenceno lineal (LAB, del inglés **L**inear **A**lky**l**benz**e**n**e**) a principios de los 60. Este producto, tras ser sometido a un proceso de sulfonación, mantenía las excelentes propiedades deterativas del sulfonato de alquilbenceno ramificado y tenía la ventaja de presentar una mayor y rápida biodegradación. De esta forma nació el sulfonato de alquilbenceno lineal (LAS, del inglés **L**inear **A**lky**l**benz**e**n**e** **S**ulphonate), actualmente el tensioactivo sintético de mayor producción mundial.

Los tensioactivos actuales pueden proceder de fuentes petroquímicas o fuentes renovables tales como aceites animales y vegetales o microorganismos, aunque todavía la mayoría proceden de fuentes petroquímicas. Sin embargo, en los últimos años, se están introduciendo en el mercado biotensioactivos producidos por microorganismos y se están desarrollando tensioactivos basados en fuentes renovables tales como los alquilpoliglucósidos, que están basados en carbohidratos³. Se espera un incremento importante en la producción de estos tensioactivos en la próximas décadas, pues presentan ventajas tales como ser

³ Deleu M., Paquot M., *From renewable vegetables resources to microorganisms: New trends in surfactants*. C. R. Chimie 7; 641-646, 2004.

biodegradables, no tóxicos y poseer propiedades especiales respecto a otros tipos de tensioactivos.

Actualmente, la demanda de tensioactivos está cubierta por menos de diez tipos, siendo los sulfonatos de alquilbenceno (LAS), sulfatos de alcoholes grasos (AS), los sulfatos éteres de alcoholes grasos (AES), alcoholes grasos etoxilados (AEO) y los jabones, los que ocupan las principales posiciones. En las siguientes figuras se puede observar la distribución del consumo mundial total de tensioactivos en los diferentes continentes⁴ y la distribución de tensioactivos consumidos en Europa Occidental⁵:

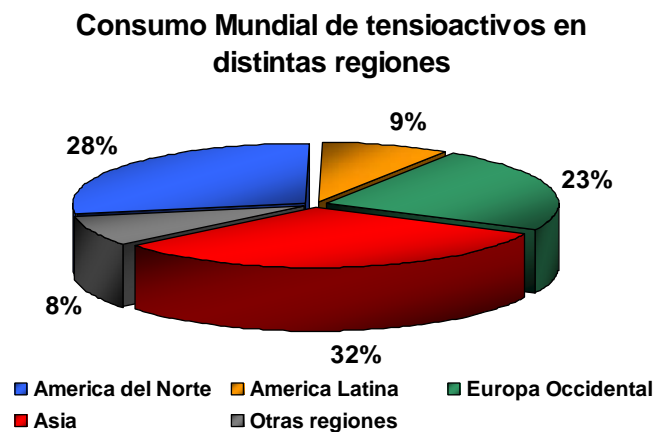
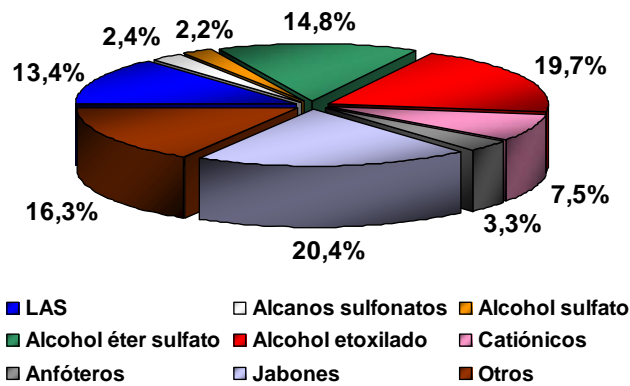


Figura 1.2 - Consumo mundial de tensioactivos por regiones (excluyendo los jabones)

⁴ ECOSOL (European Council of Studies on LAB/LAS), Statistics, Brussels, Belgium, 2001.

⁵ CESIO, General Assembly, Santiago de Compostela, Spain, September 2006.

Consumo de tensioactivos en Europa Occidental 2005



* Consumo total: 2,694 millones de toneladas

Figura 1.3 - Distribución del consumo de tensioactivos en el Mercado Europeo

En la siguiente figura se puede apreciar el consumo⁶ *per cápita* de detergentes en los diferentes países de Europa Occidental:

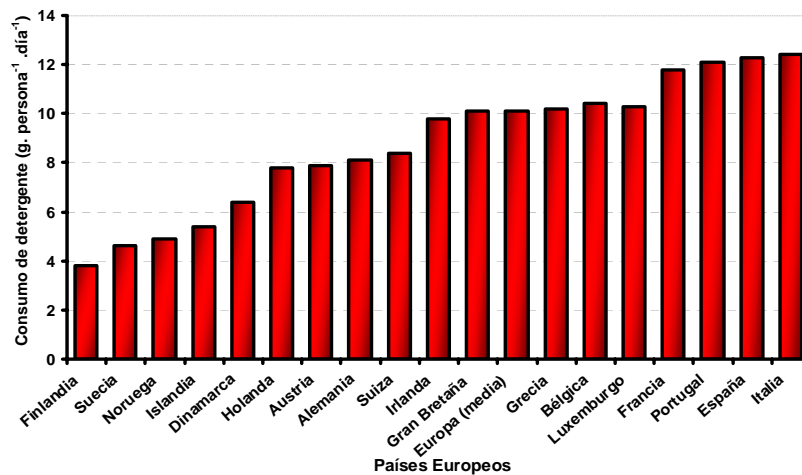


Figura 1.4 - Consumo per cápita de detergente en los países europeos

⁶ Berna J.L., *European Environmental Safety Legislation*, Handbook of Detergents. Marcel Dekker Inc., New York, USA, C.12, p. 318, 2003.

1.2 - Clasificación

El término surfactante es un neologismo desarrollado a partir de 1950, proveniente de la contracción del término “agente de actividad superficial” (del inglés, **Surface Active Agent**) y actualmente adoptado por la Real Academia Española⁷. Ha sido universalmente aceptado para describir sustancias orgánicas con ciertas características en su estructura, capaces de modificar las propiedades físicas (mecánicas, eléctricas, etc.) de una superficie o de una interfase, reduciendo la tensión superficial. No obstante, la palabra designada en todas las normativas europeas adoptadas desde de su principio hasta la actualidad, cita el término tensioactivo como la traducción de *surfactant*, razón por la cual en esta memoria se utilizará este término. Con mucha frecuencia se ha utilizado la palabra detergente en lugar de tensioactivo, sin embargo, siguiendo su definición de sustancia capaz de lavar, el detergente puede contener además sustancias inorgánicas que favorecen su acción detergente.

El tensioactivo típico es una molécula anfipática, es decir, en su composición hay dos zonas de carácter bien distinto: una hidrófila (extremidad polar que interacciona fuertemente con las moléculas de agua), y otra hidrófoba (cadena apolar de hidrocarburo que interacciona débilmente con las moléculas de agua).

Esta cadena alquílica (parte hidrófoba) está constituida básicamente por 12 - 20 átomos de carbono, pudiendo ser hidrogenada o fluorada, lineal o ramificada, conteniendo o no dobles enlaces. Los grupos hidrófilos,

⁷ Página web del Diccionario de la Real Academia Española: http://buscon.rae.es/draeI/SrvltConsulta?TIPO_BUS=3&LEMA=surfactante

pueden diferir bastante en su naturaleza química, pudiendo ser no iónicos, iónicos (catiónicos o aniónicos) o anfóteros.

La clasificación de los tensioactivos puede realizarse atendiendo a la naturaleza de su grupo hidrófilo. Así se pueden clasificar en tensioactivos⁸ no iónicos, catiónicos, aniónicos y anfóteros:

✚ **Tensioactivos aniónicos:** son los tensioactivos más ampliamente utilizados a escala mundial. La zona polar de este tipo de sustancias está cargada negativamente. El contraión (normalmente sodio, potasio o amonio) ejerce una escasa influencia sobre las propiedades superficiales de estas sustancias. Hoy en día este grupo polar negativo suele ser un grupo sulfato o sulfonato. En la **Figura 1.5** se recogen algunos ejemplos de tensioactivos aniónicos:

⁸ Filipe E.J.M., *Quando as moléculas se auto-organizam: Micelas e outras estruturas supramoleculares*. Colóquio/Ciências nº18, Fundação Calouste Gulbenkian, pp. 25-38, 1996.

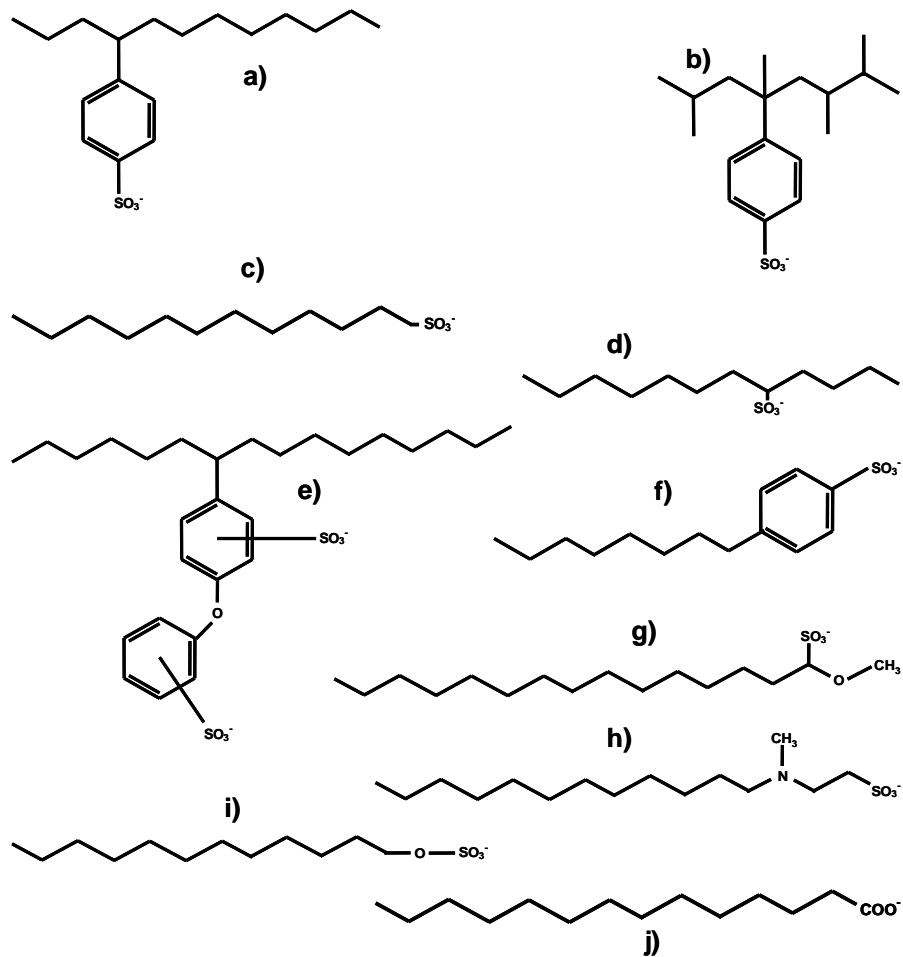


Figura 1.5 - Ejemplos de tensioactivos aniónicos: a) Sulfonato de alquilbenceno lineal (LAS); b) Sulfonato de alquilbenceno ramificado; c) Sulfonato de 1-n-alkilo; d) Sulfonato de alquilo secundario; e) Difeníléterdisulfonato de hexadecano lineal; f) Sulfonato de 4-(1-n-octil)benceno; g) Sulfonato de metiléster; h) Taurato de alquilmetil; i) Sulfato de n-alkilo; j) Carboxilato de alquilo (jabón).

✚ **Tensioactivos catiónicos:** Este tipo de sustancias están compuestas de una parte polar hidrófila cargada *positivamente*, normalmente una sal de amonio cuaternaria, amina o sal de fosfonio, unida a una zona hidrófoba que puede tener distinta naturaleza. En disoluciones ácidas, los tensioactivos no iónicos pueden adoptar carácter catiónico debido a la protonación del heteroátomo, sin embargo, estrictamente hablando, tensioactivos catiónicos son aquellos que para poseer carga positiva no requieren de protonación. Su uso es menos extendido, siendo utilizado principalmente en la industria textil como ablandadores de fibras, actuando sobre la fibra de algodón, adhiriéndose a ella y confiriéndole cierta lubricidad y suavidad, de aquí su utilización en formulaciones de productos suavizantes (principal aplicación). A este tipo de compuestos también se le atribuyen propiedades antibacterianas, por ello se usan en formulaciones de microbicidas y herbicidas. También se usan como inhibidor de la corrosión, inhibidor de procesos de oxidación, dispersante y son muy utilizados en procesos de síntesis como agente transferente entre fases.

Ejemplos de este tipo de sustancias son:

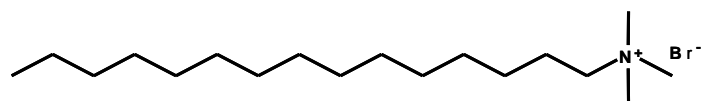
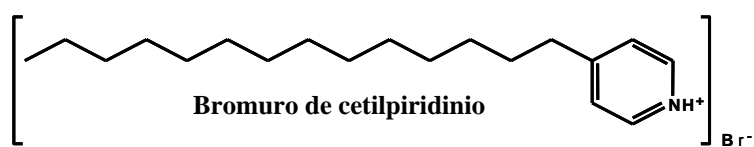


Figura 1.6 - Ejemplos de tensioactivos catiónicos.

✚ **Tensioactivos anfóteros:** Este tipo de compuestos poseen grupos funcionales que pueden ionizarse con carga negativa o positiva dependiendo de las condiciones del medio, por tanto pueden actuar como tensioactivos aniónicos o catiónicos. Pueden ser clasificados en: *anfolitos* o *betainas*. Anfolitos son compuestos que poseen al menos un protón activo. El ejemplo mejor conocido es el ácido amino carboxílico, que actúa como tensioactivo catiónico a bajos valores de pH, y como tensioactivo aniónico a altos valores de pH. Su uso en la industria es más restringido debido a su alta sensibilidad a cambios en el valor del pH del medio.

Las betainas no poseen protones hidrolizables, adquieren naturaleza catiónica en medios fuertemente ácidos. No son sensibles a la dureza del agua o al valor de pH al que comúnmente se trabaja en la industria, son sólo débilmente tóxicas, compatibles con piel y membranas mucosas además de poseer propiedades antibacterianas. Son compatibles con otros tipos de tensioactivos y presentan buenas propiedades espumantes y detergentes. A continuación se representa la estructura básica de las betainas:

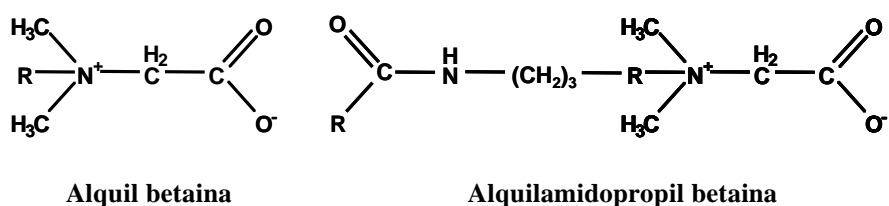


Figura 1.7 - Ejemplos de tensioactivos anfóteros

✚ **Tensioactivos no iónicos:** Son sustancias que no están ionizadas en disolución. La polaridad del átomo de oxígeno unido covalentemente en los oligoetilenglicol éteres (también denominados poliglicol éteres) y compuestos oligohidróxidos, o los átomos de oxígeno enlazados a heteroátomos, le confieren a estos tensioactivos no iónicos su solubilidad en agua como resultado de la solvatación de estos grupos por moléculas de agua. El grado de hidratación decrece con el aumento de la temperatura, disminuyendo por tanto la solubilidad en agua. La parte lipofílica debe tener una longitud que esté en consonancia con el número de grupos polares que posea el tensioactivo en cuestión, para evitar que aparezcan problemas de insolubilidad de la molécula. Los tensioactivos de este tipo más ampliamente utilizados son los alcoholes grasos etoxilados (AEO).

Los AEO se producen a partir de la condensación de óxidos de etileno, aunque también existen ciertos compuestos de este tipo basados en azúcares, polioles, etc. Los productos con menor peso molecular se encuentran en estado líquido y a medida que se incrementa su peso molecular tienden a ser más pastosos hasta llegar a un estado sólido céreo. En función del grado de etoxilación se obtienen productos con un balance hidrófilo-lipófilo distinto con múltiples aplicaciones. Forman micelas con mayor facilidad que los tensioactivos iónicos debido a que las repulsiones electrostáticas en la superficie de éstas son menores. Este tipo de compuestos son menos sensibles a la dureza del agua que los tensioactivos aniónicos. También poseen menor poder espumante, por ello pueden ser utilizados como reguladores de esta característica. Un ejemplo de este tipo de compuestos es el siguiente

En la **Figura 1.9** se puede apreciar un esquema sobre los componentes de las formulaciones actuales de tensioactivos según Domínguez⁹:

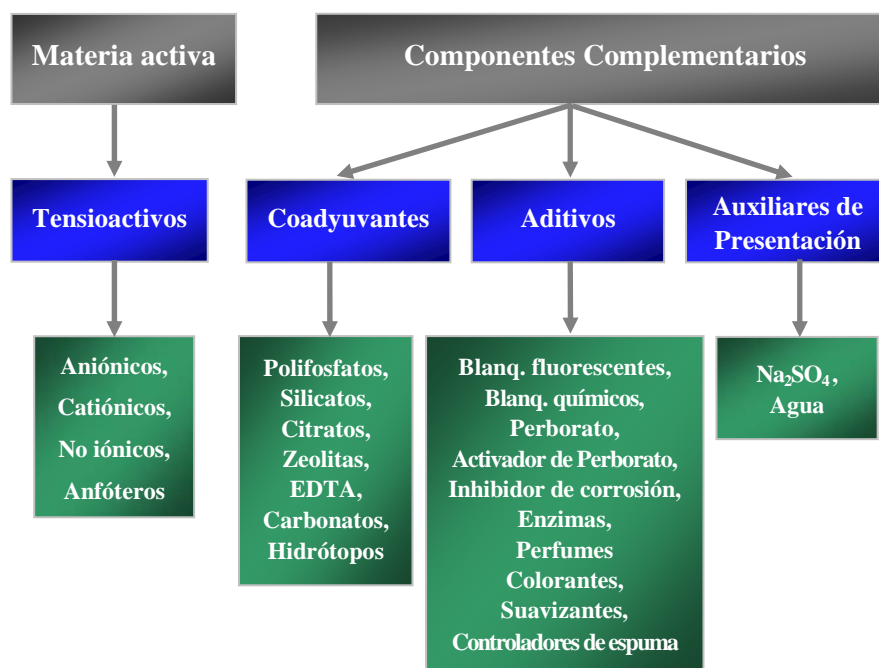


Figura 1.9 - Componentes de formulaciones de tensioactivos

⁹ Domínguez J.J.G., *Tensioactivos y Detergencia*, Ed. Dossat S.A., Madrid, España, p. 166, 1986.

2.- SULFONATO DE ALQUILBENCENO LINEAL (LAS), ALQUILFENOLES ETOXILADOS (APEO) Y ALCOHOLES ETOXILADOS (AEO). SÍNTESIS. VENTAJAS E INCONVENIENTES.

2.1 - Sulfonato de alquilbenceno lineal

El sulfonato de alquilbenceno lineal (LAS) es uno de los tensioactivos aniónicos más ampliamente utilizados en el mundo. La molécula consta de una parte hidrófila que consiste en un grupo sulfónico ($-\text{SO}_3^-$) unido al benceno en posición *para*; respecto a la parte hidrófoba, que es una cadena alquílica lineal de longitud variable y a la que se une el anillo bencénico en distintas posiciones.

La mezcla comercial de LAS contiene una serie de homólogos que difieren en la longitud de la cadena alquílica, siendo los más habituales los comprendidos entre 10 y 13 átomos de carbono y a su vez, cada uno de ellos, es una mezcla de isómeros resultante de la posición en la que el anillo bencénico está unido a esta cadena lineal. En la **Figura 1.10** se muestra un ejemplo que corresponde al 3 fenil- C_{12} *:

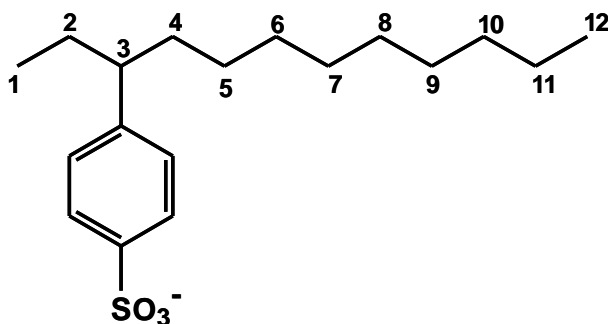


Figura 1.10 - Ejemplo de isómero de LAS.

* Normalmente se abrevia como 3ØC12

El LAS se obtiene industrialmente a partir de tecnologías petroquímicas ampliamente establecidas. Su síntesis comprende tres pasos: la obtención de parafina, la síntesis del alquilbenceno lineal (LAB) y la sulfonación posterior de éste para originar el LAS.

Algunas de las ventajas que presenta el LAS y que justifican que sea uno de los tensioactivos más utilizados en la fabricación de detergentes comerciales son:

- Poseen características generales de buen tensioactivo (poder dispersante, poder emulsionante, reducción de la tensión superficial, capacidad de mojado).
- Son muy versátiles, ya que se usan prácticamente en todos los tipos de detergentes domésticos e industriales.
- Son altamente biodegradables.
- Las materias primas requeridas para su síntesis no son caras.
- Su comportamiento en agua es bueno siendo similar al jabón en aguas con bajos niveles de dureza y mejor que éste en aguas duras.

También presenta algunos inconvenientes tales como:

- Presentan valores de detergencia inferiores que los alquilpoliglucósidos y los nonilfenoles etoxilados para superficies grasas¹⁰.
- Son derivados del petróleo.

¹⁰ Altmajer D., *Formulaciones detergentes biodegradables: Ensayos de Lavado*. Tesis Doctoral, 2004. Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Granada.

2.2 - Alquilfenoles etoxilados

Los alquilfenoles etoxilados (APEO) constituyen un grupo importante de tensioactivos no iónicos desde que fueron sintetizados por primera vez en 1940. La estructura química de los APEO está formada por una cadena alquílica, constituida normalmente por 8 o 9 átomos de carbono, un grupo aromático y una cadena polietoxilada con un número variable de unidades etoxiladas.

La síntesis de APEO comienza con la alquilación de fenol usando trimetil pentano, para originar 4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenol (4-terc-octilfenol, 4-t-OP) o usando una mezcla de isómeros de noneno para originar 4-nonilfenol (4-NP), ambas reacciones en presencia de un catalizador ácido. La composición química del noneno técnico provoca la formación de una mezcla compleja de NP, consistente en compuestos isómeros con diferentes estructuras ramificadas de la cadena nonilo. La posterior etoxilación se lleva a cabo mediante reacciones de polimerización y condensación con óxido de etileno en presencia de un catalizador básico, normalmente hidróxido potásico en medio etanólico.

El resultado es una mezcla de homólogos con longitud variable de la cadena etoxilada, que generalmente adopta una distribución de Poisson¹¹.

¹¹ Rothman A.M., *High-performance Liquid Chromatographic method for determining ethoxymer distribution of Alkylphenol Ethoxylates*. J.Chromatogr.,253-283, 1982.

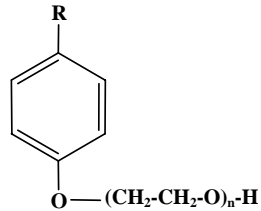


Figura 1.11 - Estructura molecular de los APEO

Dentro de los alquilfenoles etoxilados los más utilizados son el octilfenol etoxilado (OPEO) y el nonilfenol etoxilado (NPEO). El número de unidades etoxiladas puede variar entre 1 y 20. Convencionalmente cada formulación, que está compuesta por APEO con diferente número de unidades etoxiladas llamados oligómeros, se describe mediante el número medio de unidades etoxiladas.

De forma general las principales las ventajas de los APEO son:

- Variando el número de moles de unidades etoxiladas se consiguen propiedades muy diversas: bajo o alto poder espumante, solubilizante, dispersante, emulsionante, productos turbios o transparentes, etc.
- Apenas tiene incompatibilidades químicas.
- Su relación calidad/precio es elevada.

A pesar de estas buenas propiedades presentan serios inconvenientes tales como:

- Los NPEO son considerados una exhormona, su presencia en el medio ambiente parece estar correlacionada con la disminución de la calidad del semen humano¹².
- Se sospecha que podrían estar relacionados con endometriosis en las mujeres y desarreglos hormonales¹³.
- Se consideran biodegradables, pero sus metabolitos de biodegradación son más tóxicos y persistentes que el compuesto original¹⁴. Se estima que los alquifenoles (AP) pueden llegar a ser hasta 10 veces más tóxicos que los APEO de partida¹⁵.

2.3 - Alcoholes etoxilados

Los alcoholes etoxilados (AEO) pertenecen al grupo de tensioactivos no iónicos, y engloba a los derivados etoxilados de los alcoholes grasos. La mayoría de los alcoholes grasos carecen de propiedades tensioactivas debido a su insolubilidad en agua, por lo que se hacen reaccionar con polioxietileno para conferirles el carácter hidrofílico deseado.

Los AEO se obtienen a partir de alcoholes grasos obtenidos principalmente de aceite de coco, de sebo o sintéticos de cadena lineal, a los que se le une un número dado de moles de óxido de etileno (EO). Dependiendo del origen del alcohol alifático, oleoquímico o

¹² Sonnenschein C., Soto A.M., *An update review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists*. J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 65; 143-150, 1998.

¹³ Dominic M.J., House A.W., Graham F.W., *Environmental fate of Nonylphenol ethoxylates: differential adsorption of homologs to components of river sediment*. Env. Toxicol. Chem. 19; 293-300, 2000.

¹⁴ Yoshimura K., *Biodegradation and fish toxicity of non-ionic surfactants*. J. Am. Oil Chem. Soc. 63; 1590-1596, 1986.

¹⁵ Scott M.J., Jones M.N., *The biodegradation of surfactants in the environment*. Biochimica et Biophysica Acta 1505; 235-251, 2000.

petroquímico, obtendremos los homólogos pares o ambos (homólogos pares e impares), respectivamente. Como resultado del proceso de síntesis, los AEO están compuestos por una mezcla compleja de oligómeros, cuya longitud media esta comprendida entre 1 y 20 unidades etoxiladas. Esta distribución de oligómeros generalmente adopta una distribución de Poisson y afecta a las propiedades físico-químicas, biodegradabilidad en el medio y a su uso final.

Algunas ventajas que presentan los AEO son:

- Variando el número de moles de unidades etoxiladas se consiguen propiedades muy diversas.
- Su comportamiento en agua es bueno, incluso en aguas duras.
- Pueden ser eliminados de las aguas residuales mediante los tradicionales procesos biológicos de tratamiento, o por tratamientos más avanzados como la ozonización y la adsorción en carbón activo, llegando la biodegradación primaria a alcanzar valores del 97 %^{16,17}.

¹⁶ Szymanski A., Wyras B., Zbigniew S., Jaroszynski T., Lukaszewski Z., *Biodegradation of fatty alcohol ethoxylates in the continuous flow activated sludge test*. Water Research 34; 4101-4109, 2000. Battersby N.S., Sherren A.J., Bumpus R.N., Eagle R., Molade I.K., *The fate of linear alcohol ethoxylates during activated sludge sewage treatment*. Chemosphere 45; 109-121, 2001.

¹⁷ Battersby N.S., Sherren A.J., Bumpus R.N., Eagle R., Molade I.K., *The fate of linear alcohol ethoxylates during activated sludge sewage treatment*. Chemosphere 45; 109-121, 2001.

3.- PROPIEDADES Y APLICACIONES DE LOS TENSIOACTIVOS

Los tensioactivos son compuestos anfipáticos, pero no todos los compuestos anfipáticos se pueden considerar tensioactivos. Para que un compuesto de este tipo pueda ser considerado tensioactivo es necesario que posea una longitud de cadena hidrófoba de al menos ocho átomos de carbono (*hidrofobicidad mínima*) y además debe presentar una polaridad mínima (*relación hidrófila/hidrófoba adecuada*) dependiendo de las características del grupo o grupos polares presentes. Por otro lado, estos compuestos deben presentar la posibilidad de formar agregados micelares para ser considerados compuestos tensioactivos.

Las propiedades de adsorción en superficies y de asociación molecular determinan fenómenos relacionados con la aplicación de los agentes tensioactivos como son:

- *Formación de espuma*: la disminución de la tensión superficial entre un líquido y el aire hace que la superficie del líquido pueda deformarse con facilidad provocando la inclusión de multitud de burbujas de aire.
- *Formación de emulsiones y microemulsiones*: cuando dos líquidos inmiscibles se encuentran en presencia de tensioactivos, uno de ellos, por efecto de la disminución de la tensión interfacial, puede dividirse, mediante acción mecánica, en partículas de pequeño tamaño (del orden de micras). Este sistema de dos fases (pequeñas gotitas o *fase dispersa* inmersas en una *fase continua*) se denomina emulsión. Se caracterizan por su aspecto lechoso o de crema. Es

termodinámicamente inestable y con el tiempo se separa en sus dos fases originales (*proceso de coalescencia*). Cuando la fase dispersa es apolar y la continua polar, se dice que la emulsión es aceite en agua (O/W), y a la inversa, cuando la fase dispersa son gotitas de una sustancia polar y la fase continua apolar, la emulsión es agua en aceite (W/O).

Si la tensión interfacial es muy baja, pueden conseguirse sistemas dispersos en los que el tamaño de las gotas es inferior a una micra. En este caso, el sistema es termodinámicamente estable y se denomina microemulsión. Su aspecto es transparente y su viscosidad normalmente elevada. Las microemulsiones y emulsiones son de gran aplicación en cosmética, farmacia, tecnología de los alimentos, etc.

- *Solubilización*: si la cantidad de tensioactivo es suficientemente elevada, se pueden solubilizar sustancias normalmente inmiscibles entre sí. Esta propiedad es muy usada en perfumería para hacer que los perfumes (aceites) puedan estabilizarse en multitud de productos comerciales^{18,19} (cosméticos, detergentes, plásticos, etc).

- *Detergencia*: los tensioactivos pueden hacer que partículas de suciedad dejen de adherirse a las superficies que “ensucian”, gracias a la modificación del equilibrio de tensiones interfaciales del sistema formado por el sustrato (lo que está sucio), la suciedad y el baño de lavado (donde está disuelto el tensioactivo). Por esta

¹⁸ Edwards D., Liu Z., Luthy R., *Surfactant solubilization of organic compounds in soil/aqueous systems*. J. Environm. Eng. 120; 5-22, 1994.

¹⁹ Friberg S., Al-bawab A., Sandburg J., *Phase behaviour of a fragrance compound system: water/phenethyl alcohol/laureth 4/glycerol*. J. Surf. Det. 2; 159-165, 1999.

razón, los tensioactivos son el componente principal de los detergentes^{20,21,22}.

- *Transferencia de oxígeno y otros gases*: otro de los efectos más interesantes de los tensioactivos es la modificación de la transferencia de oxígeno, y cualquier gas en general, a través de membranas.

- *Concentración Micelar Crítica (CMC)*: Esta es una propiedad característica de sustancias anfipáticas. Este tipo de moléculas poseen un comportamiento particular cuando se encuentran en disolución, ya que cada zona de la molécula con diferente solubilidad trata de distribuirse en el medio (sea acuoso o no) de manera que las colas lipofílicas se agrupen entre sí, al igual que los grupos hidrofílicos entre sí, formándose a partir de una determinada concentración, un conglomerado de estructura definida que recibe el nombre de *micela*. Estas micelas pueden tener formato esférico (a bajas concentraciones de tensioactivo) o elipsoidal (a altas concentraciones de tensioactivo o en presencia de electrolitos). Gracias a sus propiedades espaciales, las micelas presentan un alto poder solubilizante de sustancias insolubles en fase acuosa, además de una capacidad de solubilización selectiva de diferentes especies químicas. Por debajo del valor de CMC, el

²⁰ Drachev G., Semiletova I., Kovarskii N., *Detergency of non-ionic surfactants in hydrophobic washing compositions*. Colloid Journal 56; 34-35, 1994.

²¹ Prieto N., Lilienthal W., Tortorici P., *Correlation between spray clearing detergency and dynamic surface tension of non-ionic surfactants*. J. Am. Oil Chem. Soc. 71; 65-73, 1996.

²² Verma S., Kumar V., *Relationship between oil-water interfacial tension and oily soil removal in mixed surfactants systems*. J. Coll. Interf. Science 207; 1-10, 1998.

tensioactivo se encuentra en forma de monómeros²³. A continuación se representa este proceso.

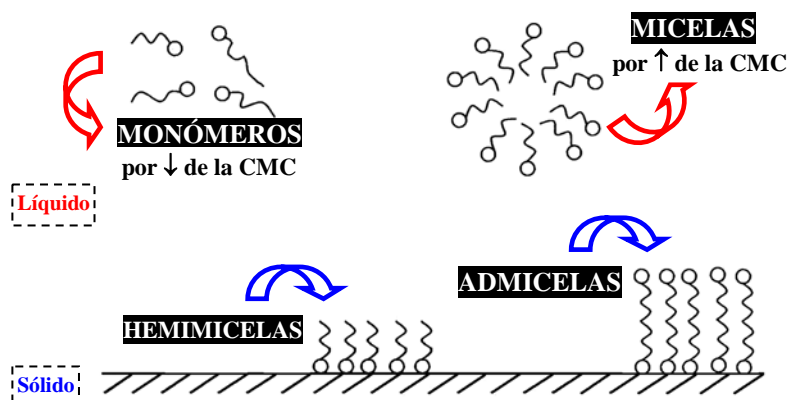


Figura 1.12 - Ejemplo del proceso de micelización de un tensioactivo

Las propiedades anteriormente señaladas confieren una gran versatilidad a los tensioactivos para ser utilizados en multitud de aplicaciones: productos farmacéuticos, formulaciones detergentes, operaciones con metales, flotación, alimentación, etc.

En la **Tabla 1.1** se muestran los tensioactivos más usados en diversas industrias y su aplicación. Los detergentes son (al menos en cuanto a tonelaje) junto a la cosmética, la aplicación principal de los tensioactivos. Por otra parte, en la **Tabla 1.2** se muestra las composiciones orientativas de formulaciones detergentes utilizadas en textiles y superficies duras²⁴ (cristales, azulejos, metales, etc).

²³ Fernández A., Schulman S.G., *Fosforescencia Molecular Analítica: Una aproximación Práctica*, Ed. Unv. Gr., Granada, España, 2001.

²⁴ Bailón R., *Ingeniería del Conocimiento y Vigilancia Tecnológica aplicada a la Investigación en el Campo de Tensioactivos. Desarrollo de un Modelo Científico Unificado*. Tesis Doctoral, 2003. Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Granada.

Tabla 1.1 - Principales tensioactivos y sus aplicaciones.

TIPO DE INDUSTRIA	TENSIOACTIVOS	CAMPOS DE APLICACIÓN
ALIMENTARIA	Acilglicerol, Ésteres de sorbitano, Copolímeros de óxido de etileno-propileno, Alquilsulfatos, Ésteres de poliglicol	Emulsiones Humectantes Antiespumantes Limpieza de instalaciones
CURTIDOS	Nonilfenoles etoxilados, Alcoholes etoxilados, Monoésteres de ácidos grasos sulfatos, Alquilsulfatos, Alquilnaftalensulfonatos, Lignin-sulfatos, Aceites saturados	Humectación Desengrase Tintura Engrase Pastas de pigmento
PINTURAS, LACAS Y TINTES	Condensados de naftalensulfonato y formaldehído, Alquilsulfatos, Dialquilsulfosuccinato sódico, Alcoholes etoxilados, Aminas etoxiladas	Dispersión de pigmentos Modificadores de fluidez Emulsionantes de resinas
AGRICULTURA	Sulfonatos de alquilbenceno, Nonilfenoles etoxilados, Ésteres fosfatados, Poliglicoles, Aceites sulfatados	Emulsionantes de plaguicidas y herbicidas Humectantes y dispersantes Emulsiones oleosas
COSMÉTICA	Ésteres de poliglicol, Óxidos de amina, Alcoholes etoxilados, Alquilpoliéter sulfatos, Alcanolamidas, Alquilbetainas, Dialquilsulfosuccinatos	Emulsiones de cremas cosméticas Champúes Geles Jabones de tocador Solubilizantes de perfumes Emulsionantes para aceites esenciales
DETERGENTES	Sulfonatos de alquilbenceno, Olefin-sulfonatos, Parafin-sulfonatos, Alcoholes etoxisulfatos, Alquil poliéter sulfatos, Óxidos de amina, alquilfenoles etoxilados, alcanolamidas, sulfonatos de ácidos grasos, Sales de amonio cuaternario	Detergentes en polvo Detergentes líquidos Estabilizadores de espuma Productos limpieza de superficies duras Lavavajillas Limpiadores textiles

Tabla 1.1 - Principales tensioactivos y sus aplicaciones. (cont.)

TIPO DE INDUSTRIA	TENSIOACTIVOS	CAMPOS DE APLICACIÓN
PAPELERA	Ésteres de poliglicoles, Alcoholes etoxilados, Polipropilen-glicoles, Aminas etoxiladas, Nonilfenoles etoxilados	Agentes humectantes de la pulpa Eliminación de espuma de la pulpa Emulsionantes de ceras Reutilización del papel
PETRÓLEO Y DERIVADOS	Alquilpoliéter sulfatos, Alcanolamidas, Imidazolinás, Poliglicoles, Alquilpoliéter sulfatos, Lign-sulfonatos, Poliglicoles, Ésteres sulfonados, Sulfonatos de alquilbenceno	Ruptura de emulsiones Dispersantes Recuperación de petróleo Eliminación de mareas negras
PLÁSTICOS Y GOMAS	Sulfonatos de alquilbenceno, Alcoholes etoxilados, Alquilsulfatos, Copolímeros de óxido de etileno-propileno, Amidas etoxiladas, Dialquilsulfosuccinato, Sales de amonio cuaternaria	Emulsionantes Agentes electrostáticos Modificadores de viscosidad Controladores del olor Polimerización en emulsión
TEXTILES	Sulfonato de alquilbenceno, Nonilfenoles etoxilados, Sales de amonio cuaternaria, Aceites naturales etoxilados, Alcoholes etoxilados, Ésteres de poliglicol, Ésteres sulfonados, Sulfonatos de petróleo	Detergentes y auxiliares de humectación Agentes antielectrostáticos Suavizantes y lubricantes Aceites autoemulsionables Jabones para limpieza en seco

Tabla 1.2 - Composiciones orientativas de formulaciones detergentes.

PRODUCTO	COMPOSICIÓN
Detergente textil lavadora	Tensioactivos aniónicos, jabones, álcalis, secuestrantes, dispersantes, activadores, blanqueantes ópticos, enzimas, colorantes, perfume
Suavizante textil	Tensioactivos catiónicos, perfume, colorante
Lavavajillas manual	Tensioactivos aniónicos, tensioactivos no iónicos, conservante, perfume, colorantes
Lavavajillas de máquina	Tensioactivos no iónicos, álcalis, secuestrantes, dispersantes, oxidantes, colorantes
Limpiahogar	Tensioactivos no iónicos, tensioactivos aniónicos, glicoles, secuestrantes, perfume, colorantes
Limpiacristales	Alcoholes, tensioactivos aniónicos, perfume

La selección del tensioactivo o de los tensioactivos empleados en una formulación comercial dependerá de la ponderación de sus costes y propiedades particulares de cada uno de los tensioactivos disponibles, con la finalidad de obtener costes más bajos con una adecuada propiedad de limpieza.

4.- IMPLICACIONES AMBIENTALES. ACTIVIDAD MEDIOAMBIENTAL

La presencia de los tensioactivos en el medio puede ocasionar diversas consecuencias a los individuos que habitan en él, por tanto un aspecto esencial es el estudio de su ecotoxicidad.

El riesgo ambiental de las sustancias químicas se estima comparando la relación entre la concentración previsible en el medio (*predicted environmental concentration* - PEC) y la concentración máxima esperada que no produzca ningún efecto (*predicted no-effect concentration* - PNEC). La relación PEC/PNEC debe ser siempre inferior a la unidad para que el riesgo ambiental sea bajo.

En el caso del LAS, las concentraciones que se encuentran en aguas dulces y marinas frecuentemente se sitúan en el rango de pocos $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Pueden encontrarse cantidades más elevadas en localizaciones donde el tratamiento de aguas residuales es inadecuado o incluso inexistente. En comparación con el valor de $270 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, que es el valor de PNEC calculado por HERA (Humand & Environmental Risk Assessment on ingredients of European household cleaning products)²⁵, la mayoría de las concentraciones medioambientales están por debajo de este valor, indicando que los residuos de LAS detectados rutinariamente en aguas de río y marinas no suponen riesgo para los organismos acuáticos. Con respecto al PNEC del LAS en sedimentos ($8.1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, de acuerdo con HERA), los valores encontrados suelen estar por debajo de este valor,

²⁵ HERA Risk assessment of LAS, version nº 9, July 2002.

indicando una eficiente eliminación de LAS en las depuradoras previo a su vertido al medio ambiente.

La ecotoxicidad de los principales metabolitos del LAS, los ácidos sulfonilcarboxílicos (SPCs), ha sido estudiada, por distintos autores, en organismos acuáticos encontrando que el LC_{50} (concentración que resulta letal para el 50% de los organismos expuestos durante un período especificado, normalmente 96 horas) se incrementa entre 200 y 300 veces por la carboxilación de un grupo metilo terminal de la cadena alquílica y de 10 a 20 veces a través del acortamiento de la cadena. Esto se atribuye al hecho de que la toxicidad del LAS está directamente asociada con sus propiedades de actividad superficial y la oxidación de la cadena alquílica da lugar a la pérdida de estas propiedades.

En la **Tabla 1.3** se recoge la relación de PEC/PNEC del LAS en diversos ecosistemas. La relación obtenida en todos los casos es menor que la unidad, lo que indica su bajo índice de toxicidad ambiental.

Tabla 1.3 - Relación PEC/PNEC del LAS en diferentes medios ambientales

Ecosistemas	PEC/PNEC
Agua ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.17
Suelo ($\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$)	0.30
Sedimentos ($\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$)	0.65
EDAR ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.04

Numerosos países y agencias de protección, ha llevado a cabo el seguimiento del riesgo medioambiental de los APEO y AP, siendo quizá el más elaborado el desarrollado por *Environment Canada*²⁶. En este documento se atribuye para el NP₁EO y NP₂EO un valor de PEC de 9.9 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y de PNEC de 1.1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, siendo el cociente PEC/PNEC de 9.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Con respecto al riesgo ambiental del nonilfenol (NP) ha sido evaluado por la CE, atribuyendo valores de PEC para el NP de 0.6 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y de PNEC de 0.33 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. El cociente PEC/PNEC es de 1.8, indicando que el uso de NPEO supone un riesgo ambiental importante.

Con respecto a los AEO, se han llevado a cabo numerosos estudios tanto “*in vivo*” como “*in vitro*”, concluyendo que no existen evidencias de que éstos tensioactivos sean genotóxicos, mutagénicos o cancerígenos.²⁷

En la **Tabla 1.4** se recogen los valores de la relación PEC/PNEC para alcoholes etoxilados en diferentes compartimentos ambientales. Para ello se han usado dos métodos distintos, uno determinístico (emplea la especie *Daphnia magna*) y otro probabilístico (emplea 17 especies distintas).

²⁶ Environment Canada and Health Canada, 2000. Canadian Environmental Protection Act, Priority Substances List Assessment Report: Nonylphenol and its Ethoxylates. 134p.

²⁷ Informe HERA, Alcohol Ethoxylates, Mayo 2007.

Tabla 1.4 - Relación PEC/PNEC de AEO en diferentes medios ambientales.

Ecosistemas	PEC/PNEC Determ.	PEC/PNEC Probab.
Agua (mg·L ⁻¹)	0.042	0.024
Suelo (mg·Kg ⁻¹)	0.316	0.181
Sedimentos (mg·Kg ⁻¹)	0.103	0.068
EDAR (mg·L ⁻¹)	0.007	-

En todos los casos la relación PEC/PNEC es menor que la unidad, por lo que puede concluirse que el uso de AEO no conlleva riesgo para el medio ambiente.

Se han descrito diversos efectos que los tensioactivos pueden causar sobre las membranas celulares y proteínas debido a la actividad superficial que presentan²⁸. Como consecuencia de estos efectos, pueden ser inhibidores de bacterias²⁹, hongos y otros habitantes del ecosistema del suelo^{30,31,32}. Por esta razón la exposición del suelo de cultivo a estos compuestos puede alterar su actividad biológica, acción que es muy

²⁸ Schwuger M.J., Bartnik F.G., *Interaction of anionic surfactants with proteins, enzymes and membranes*. In Gloxhuber C. Ed, *Anionic Surfactants-Biochemistry, Toxicology, Dermatology*. Marcel Dekker, New York, USA, pp 1-49, 1980.

²⁹ Hartmann L., *Effect of surfactants on soil bacteria*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 1; 219-224, 1996.

³⁰ Holmstrup M., Krogh P.H., *Effects of an anionic surfactant, linear alkylbenzene sulfonate, on survival, reproduction and growth of the soil-living collembolan Folsomia fimetaria*. Environ. Toxicol. Chem. 15; 1745-1748, 1996.

³¹ Wilke B., *Effects of non-pesticide organic pollutants on soil microbial activity*. Adv. GeoEcol. 30; 117-132, 1996.

³² Jensen J., *Fate and effects of LAS in the terrestrial environment*. Sci. Tot. Environ. 226; 93-111, 1999.

importante para la calidad del suelo y del ciclo nutricional³³, además pueden inhibir notablemente bacterias reductoras de hierro y afectar tanto a bacterias Gram-negativo como Gram-positivo³⁴.

En el caso del LAS se puede afirmar que a medida que aumenta la longitud de la cadena alquílica lineal, aumenta la toxicidad del compuesto³⁵. Para los isómeros, la toxicidad disminuye para aquellos con el anillo aromático más lejos del extremo de la cadena alquílica.

Con respecto a los tensioactivos no iónicos de tipo polietoxilado, la toxicidad incrementa al disminuir la longitud de la cadena etoxilada^{36,37}. Por otro lado, si comparamos la toxicidad de los alcoholes etoxilados con la de los alquilfenoles etoxilados, los últimos resultan ser menos tóxicos³⁸, sin embargo, los productos resultantes de su degradación (alquilfenoles sin etoxilar o con bajo grado de etoxilación) son persistentes, y su potencial estrogénico se ha puesto de manifiesto en numerosos trabajos tanto “*in vitro*” como “*in vivo*”^{39,40}.

³³ Turco R.F., Kennedy A.C., Jawson M.D., *Defining soil quality for a sustainable environment*. Soil Society of America (Special Edition 35), Madison, USA, p. 73-90, 1994.

³⁴ Elsgaard L., Petersen S.O., Deboz K., Kristiansen I.B., *Effects of LAS on soil microbiology*. Tenside Surf. Det., 38; 2, 94-97, 2001.

³⁵ BKH Consulting Engineers, *The use of existing data for estimation of the maximum tolerable environmental concentration of LAS*. Part I: main report. Part II: data list, BKH, Deft, Netherlands, 1993.

³⁶ Swisher R.D., *The Chemistry of surfactant biodegradation*. J. Am. Oil Chem. Soc 40; 648-656, 1963.

³⁷ Ahel M., Giger M., *Determination of alkylphenols and alkylphenol mono and diethoxylates in environmental samples by high performance liquid chromatography*. Anal. Chem. 57; 1557-1583; 1985.

³⁸ García M., Ribosa I., González J., Salvia R., Megías J., *Estudio del impacto ambiental de tensioactivos no iónicos etoxilados*. 25 Jornadas Anuales del CED 25; 155-169. Barcelona. España.

³⁹ Jobling S., Sheahan D., Osborne J.A., Matthiessen P., Sumpter J.P., *Inhibition of testicular growth in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals*. Environ. Toxicol. Chem. 15; 194-202, 1996.

El amplio uso de tensioactivos, ya sea a nivel doméstico o industrial, genera una gran cantidad de aportes a las aguas residuales que deben ser tratadas en plantas depuradoras (EDAR) previamente a su vertido a diversos ecosistemas (afluentes, mares, ríos, lagos, etc) o a su utilización como agua de riego. Los lodos generados, ricos en materia orgánica, pueden ser adecuadamente tratados y desecados para obtener el compost, y de esta manera, ser utilizados como abono en las tierras de cultivo. A veces, los lodos se aplican directamente como enmendantes en campo y por esta razón se pueden encontrar cantidades relativamente altas de tensioactivos en el medio ambiente.

En la **Figura 1.13** se representa los destinos más comunes de los tensioactivos en el medio ambiente⁴¹.

⁴⁰ Sonnenschein C., Soto A.M., *An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists*. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 65; 143-150, 1998.

⁴¹ Feijtel T.C.J., van der Plassche E.J., *Environmental risk characterization of 4 major surfactants used in the Netherlands*. National Institute of Public Health and Environmental Protection, Report nº 679101 025, Bilthoven, Netherlands, 1995

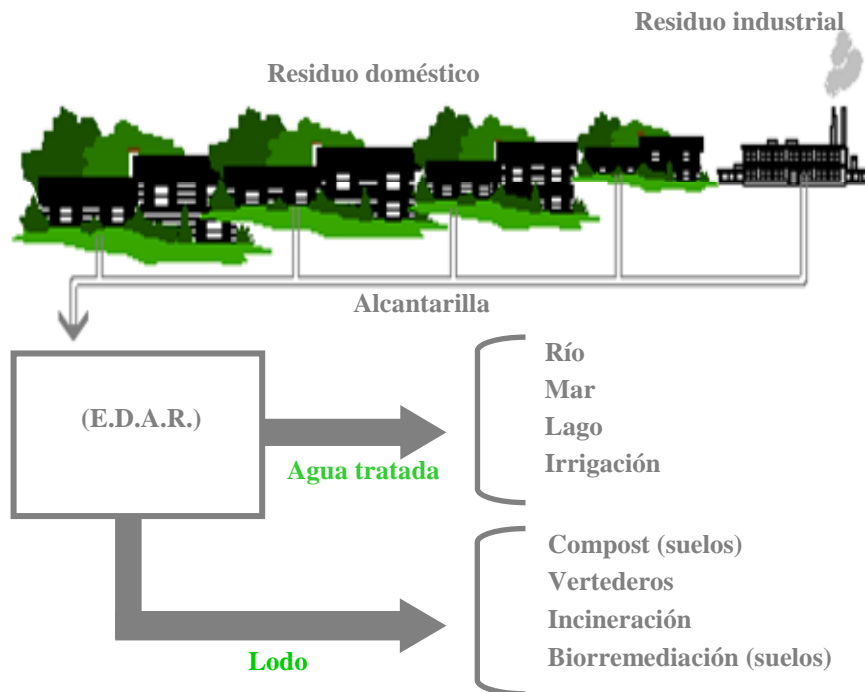


Figura 1.13 - Destinos de los tensioactivos en el medio ambiente

5.- BIODEGRADACIÓN. CONCEPTO Y EVALUACIÓN

En las últimas décadas, el comportamiento de los contaminantes químicos en el medio ambiente se ha convertido en un tema extremadamente importante. Por ello se han desarrollado numerosos métodos para la investigación y vigilancia de un elevado número de compuestos, entre ellos los tensioactivos⁴². Aunque la eliminación de estos productos del medio ambiente acuático puede ocurrir mediante procesos abióticos tales como adsorción, hidrólisis y fotólisis, la conversión total de la materia orgánica en productos inorgánicos es debida a procesos de biodegradación microbiana⁴³.

El aumento en el consumo de detergentes a partir de los años 50 coincidió con la aparición de espumas persistentes en los ríos que, además del impacto visual que generaban, impedían el adecuado intercambio de oxígeno entre la atmósfera y el medio acuático, produciéndose por tanto un empobrecimiento en el nivel de oxígeno y la consecuente muerte de diversas especies. Este fenómeno se puso de manifiesto en el río Necker (Alemania), con concentraciones de $0.7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de tensioactivos aniónicos.

Se comprobó que uno de los principales responsables de la espuma observada era el sulfonato sódico de tetrapropileno, tensioactivo muy empleado por entonces en las formulaciones detergentes. Debido a su compleja estructura ramificada, no era biodegradado con facilidad.

⁴² Battersby N.S., *A review of biodegradation kinetics in the aquatic environment*. Chemosphere 21; 1243-1284, 1990.

⁴³ Swisher R.D., *Surfactant biodegradation* (2ª Edición). Marcel-Dekker Inc. Nueva York. E.E.U.U., 1987.



Figura 1.14 - Formación de espuma en un río contaminado por el BABS⁴⁴.

Otro problema añadido era la acumulación de espumas en plantas depuradoras, que también provocaba la muerte de los microorganismos que actuaban en los lodos activados bajo condiciones aerobias, disminuyendo de este modo considerablemente la eficiencia de degradación de la planta depuradora.

La solución técnica al problema de las espumas llegó en la década de los 60, con la sustitución de los sulfonatos ramificados de alquilbenceno por el LAS, lo que prácticamente hizo desaparecer las espumas debidas a esta causa. El LAS con su cadena alquílica lineal es fácilmente accesible para los microorganismos y por tanto es fácilmente biodegradable, de hecho el rendimiento de una planta depuradora suele ser bastante alto^{45,46} (98 - 99 %). En la **Figura 1.15** se resume el proceso de depuración de las aguas residuales:

⁴⁴ Eichhorn P., *Surfactants and their aerobic degradation products: formation, analysis, and occurrence in the aquatic environment*. Dissertation of Doctoral Thesis. University of Mainz, Mainz, Germany, p. 5, 2001.

⁴⁵ Cavalli L., Gellera A., Lazarrin A., Nuci G.C., Tomano P., Ranzani M., Lorenzi E., *Linear alkylbenzene sulphonate removal and biodegradation in a metropolitan plant for water treatment*. Riv. Ital. Sostanze Grasse 68; 75-81, 1991.

⁴⁶ Cavalli L., Gellera A., Landone A., *LAS removal and biodegradation in wastewater treatment plant*. Environ. Toxicol. Chem. 12; 1777-1788, 1993.

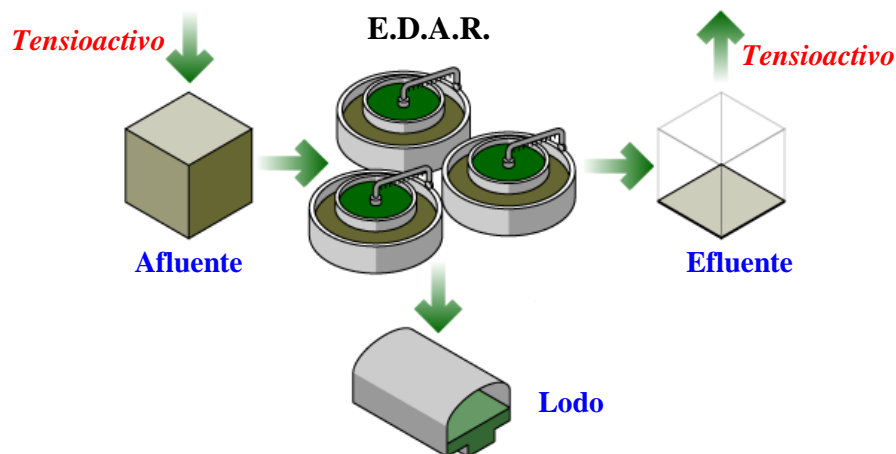


Figura 1.15 - Esquema de tratamiento de tensioactivos en una EDAR

De forma parecida, los alcoholes lineales más biodegradables han reemplazado a los alcoholes y alquifénoles de cadena altamente ramificada en la fabricación de polietoxilados no iónicos, alquilsulfatos y alquiltióéter sulfatos para las aplicaciones de detergentes de uso doméstico.

Para que la acción de los microorganismos pueda solucionar el problema de la contaminación originada por tensioactivos, es preciso que éstos se degraden fácilmente y en un tiempo relativamente corto. De aquí la división entre tensioactivos *duros* y *blandos*, según su velocidad y resistencia a la biodegradación.

Se entiende por **biodegradación** la ruptura molecular de un sustrato orgánico, resultante de la acción enzimática de microorganismos vivos que utilizan este sustrato como alimento. La problemática medioambiental surgida en la biodegradación de moléculas complejas, determinó la importancia de la distinción de diferentes tipos de

biodegradabilidad, cuyo concepto está incorporado en la legislación vigente. Así, se distingue entre:

a) **Biodegradación primaria** se refiere a la que ocurre en el sustrato que permite la pérdida de las propiedades características de la molécula intacta. En el caso de los tensioactivos, está relacionada con la pérdida de su capacidad para formar espuma o con la reducción de la tensión superficial.

b) **Biodegradabilidad avanzada** se alcanza cuando la molécula de sustrato se divide en segmentos más pequeños.

c) **Biodegradación final, última o mineralización**, es la que, a través de una secuencia de ataques enzimáticos, reduce el sustrato a la estructura más simple posible. Bajo este término se engloban todos aquellos procesos realizados por agentes microbiológicos medioambientales que convierten la materia orgánica compleja en compuestos más simples que pueden ser utilizados como nutrientes y generar energía además de ser transformados en material inorgánico después de sufrir diferentes procesos químicos.

Cabe destacar que estos procesos se pueden llevar a cabo bajo diferentes niveles ambientales de oxígeno:

- *Condiciones aerobias*. El flujo de oxígeno excede a la demanda que la actividad bacteriológica pueda requerir.

- *Condiciones anaerobias*. Se pueden distinguir a su vez dos tipos de situaciones:
 - aquellas donde la velocidad de consumo de oxígeno excede a la velocidad de difusión (*condiciones anóxicas*).
 - aquellas donde el oxígeno es totalmente excluido (*condiciones estrictamente anaerobias*).

5.1 - Métodos analíticos para el seguimiento de la biodegradación

Existen multitud de métodos analíticos para estimar el progreso y extensión de la biodegradación de tensioactivos. Las técnicas analíticas usadas pueden hacer uso de propiedades físicas o químicas del propio tensioactivo o de sus intermedios de biodegradación. También es posible la medida de parámetros relacionados con la biodegradación como son el oxígeno consumido o CO₂ producido por los microorganismos.

Los métodos analíticos empleados pueden clasificarse en:

- *Métodos físicos o no específicos*: Se basan en la medida de alguna propiedad física del sistema que contiene al tensioactivo, tales como formación de espuma o disminución de la tensión superficial. Se denominan no específicos porque no distinguen entre tensioactivos aniónicos, catiónicos o no iónicos.
- *Métodos químicos o semiespecíficos*: Se basan en la formación de un compuesto o complejo con el tensioactivo para extraerlo, seguido de determinación espectrofotométrica o colorimétrica.

Tienen como principal inconveniente su baja sensibilidad a los homólogos de menor cadena carbonada^{47,48}. Distinguen entre las distintas clases de tensioactivos, pero no al tensioactivo concreto, por ello se les denomina semiespecíficos.

- *Métodos físico-químicos o específicos*: Permiten distinguir entre los tensioactivos de una misma clase e incluso pueden llegar a permitir la determinación de oligómeros, homólogos e isómeros. Aquí, las técnicas cromatográficas resultan de gran utilidad por su selectividad, sensibilidad y versatilidad.
- *Métodos metabólicos y otros métodos no específicos*: Algunos ejemplos son la DQO (Demanda Química de Oxígeno), DBO (Demanda Biológica de Oxígeno), crecimiento bacteriano y toxicidad.

5.2 - Modelos matemáticos

El empleo de modelos matemáticos que intentan explicar la degradación de los compuestos químicos en matrices medioambientales, como el suelo, han sido una herramienta ampliamente utilizada.

El objeto de la cinética química es medir las velocidades de las reacciones químicas, definiendo esta última como la variación con el

⁴⁷ Sivak A., Goyer M., Perwak J., Thayer P., *Environmental and human aspects of commercially important surfactants. Solution behaviour of surfactants*, vol. I. Ed. Plenum Publishing Co; 161-188, 1982.

⁴⁸ Patozca J., Pulliam G., *Biodegradation and secondary effluent toxicity of ethoxylated surfactants*. Wat. Res. 24; 965-972, 1990.

tiempo de la concentración de una de las sustancias, reactivos o productos que toman parte en la misma.

Para el reactivo X su velocidad de desaparición, supuesta una cinética de primer orden, puede expresarse como:

$$-\frac{d[X]}{dt} = k[X] \quad (1.1)$$

Integrando, resulta la ecuación (1.2):

$$[X] = [X]_0 \cdot e^{-kt} \quad (1.2)$$

donde $[X]_0$ es la concentración inicial de tensioactivo, k la constante de velocidad del proceso y t el tiempo de degradación. También puede ser expresada a través de una ecuación lineal (1.3). De esta forma, se permite calcular el valor de las constantes de degradación y el tiempo de vida media ($t_{1/2}$), dado por (1.4).

$$\ln [X] = \ln [X]_0 - kt \quad (1.3)$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (1.4)$$

El modelo lineal (monofásico o cinética de un compartimiento) basado en la ecuación exponencial de primer orden, es uno de los más empleados^{49,50}.

⁴⁹ Krueger C.J., Radakovich K.M., Sawyer T.E., Barber L.B., Smith R.L., Field J.A., 1998. *Biodegradation of the surfactant linear alkylbenzenesulfonate in sewage contaminated groundwater: A comparison of column experiments and field tracer tests*. Environ. Sci. Technol. 32; 3954-3961, 1998.

⁵⁰ Larson R.J., Federle T.W., Shimp R.J., Ventullo R.M., *Behaviour of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in soil infiltration and groundwater*. Tenside Surf. Det. 26; 116-121, 1989.

Cuando la degradación no se ajusta a una cinética de primer orden, se pasaría a un modelo bifásico^{51,52,53}. Existen varias ecuaciones empíricas no lineales que describen el modelo de degradación bifásico, como puede ser el modelo de compartimiento protegido (“*Protected Compartment Model*”), el modelo bioexponencial o la ecuación de Hoerl.

Sin embargo, en la evaluación del comportamiento de sustancias químicas en sistemas medioambientales, los compuestos que más comúnmente son estudiados por la mayoría de los modelos desarrollados actualmente hacen referencia, indudablemente, a los pesticidas debido a su extensa utilización en la agricultura. Es por esto que gran parte de las publicaciones científicas se centran en la utilización de estos recursos buscando evidenciar el comportamiento de estas especies químicas.

Para esta finalidad se han aplicado modelos matemáticos más complejos^{54,55,56}. Destaca el modelo denominado FOCUSPELMO 1.1.1 (o PELMO 3.2), basado en el modelo PELMO, que es un modelo compartimental de simulación del movimiento de sustancias químicas en

⁵¹ Romero E., Dios G., Mingornace M.D., Matallo M.B., Peña A., Sánchez-Rasero F., *Photodegradation of mecoprop and dichlorprop on dry moist and amended soil surfaces exposed to sunlight*. Chemosphere 37; 577-589, 1998.

⁵² Madsen P.L., Thyme J.B., Henriksen K., Møldrup P., Roslev P., *Kinetics of di-(2-ethylhexyl)phthalate mineralization in sludge-amended soil*. Environ. Sci. Technol. 33; 2601-2606, 1999.

⁵³ Beulke S., Brown C.D., *Evaluation of methods to derive pesticide degradation parameters for regulatory modelling*. Biol. Fertil. Soils 33; 558-564, 2001.

⁵⁴ Cohen S.Z., Wauchope R.D., Klein A.W., Eadsforth C.V., Graney R., *Offsite transport of pesticides in water: mathematical models of pesticide leaching and runoff*. Pure Appl. Chem. 67, 2109-2148, 1995.

⁵⁵ Klein M., Müller M., Dust M., Görlitz G., Gottesbüren B., Hassink J., Kloskowski R., Kubiak R., Ressler H., Schäfer H., Sterin B., Vereecken H., *Validation of the pesticide leaching model PELMO using lysimeter studies performed for registration*. Chemosphere 35; 2563-2587, 1997.

⁵⁶ Klein M., Hosang J., Schäfer H., Erzgräber B., Ressler H., *Comparing and evaluating pesticide leaching models - Results of simulations with PELMO*. Agric. Water Manage. 44; 263-281, 2000.

el suelo, en la zona no saturada. Este modelo considera la existencia de movimientos de convección y dispersión del soluto. Desde la primera versión (PELMO 2.01), se han realizado varias mejoras entre las que se contempla la posibilidad de formación de CO₂ en el proceso de degradación de metabolitos (PELMO 3.0)⁵⁷.

La validación se ha realizado con resultados obtenidos con lisímetros⁵⁸, y recientemente se ha introducido la posibilidad de la utilización de escenarios FOCUS o la creación de un escenario específico (FOCUS 2000)⁵⁹.

También se puede mencionar el modelo HERSIM, usado para calcular la desaparición de herbicidas en función del tiempo, considerando fenómenos como la adsorción, la actividad microbiana y el efecto de la temperatura.

De modo genérico, fundamentalmente, estos modelos llevan en consideración algunos parámetros como: **a)** parámetros climatológicos (tasa de evaporación, precipitación diaria, temperatura media diaria, humedad relativa del aire); **b)** parámetros de la sustancia química relacionados con su adsorción o su transporte en el suelo (K_{oc} , K_d o K_f , exponente de Freundlich - $1/n$); **c)** parámetros de la sustancia química

⁵⁷ Jene B., *PELMO 3.00, Manual Extensión. SLFA Neustadt, Ecology Department, Staatliche Lehr - und Forschungsanstalt für Landwirtschaft, Weinbau und Gartenbau, Neustadt, Alemania, 1998.*

⁵⁸ Fent G., Jene B., Kubiak R., Performance of the Pesticide Leaching Model PELMO 2.01 to predict the leaching of bromide and ¹⁴C-benazolin in a sandy soil in comparison to results of a lysimeter - and field study. *Staatliche Lehr - und Forschungsanstalt für Landwirtschaft, Weinbau und Gartenbau (SLFA), Neustadt, Poster Abstract 6B-030, IUPAC Congress Book of Abstracts, London, 1998.*

⁵⁹ FOCUS, *FOCUS groundwater scenarios in the EU review of active substances.* Documento de FOCUS Groundwater Scenarios Workgroup, EC. Sanco/321/200 rev, p. 202, 2000.

relacionados con su degradación (constante de degradación considerada en una cinética de primer orden); **d**) parámetros referentes al suelo (densidad real del suelo, contenido en carbono orgánico, descripción de la textura del suelo); **e**) parámetros relacionados con la aplicación de la sustancia al suelo (dosis, tipo y profundidad de aplicación); entre otros factores.

5.3 - Rutas de biodegradación

Los mecanismos aceptados como principales responsables de la ruptura de una molécula orgánica, son tres: ω -oxidación, β -oxidación y oxidación aromática⁴³.

El mecanismo de ω -oxidación es el que interviene en la degradación de las moléculas de hidrocarburos de alto peso molecular, y como producto final da lugar a una molécula de ácido graso.

La β -oxidación consiste en un acortamiento de la cadena hidrocarbonada en dos unidades, con liberación de un radical acetato. Sucesivas etapas de β -oxidación provocan la total conversión de la molécula original en CO₂, agua y biomasa. En un sistema aerobio, el hidrógeno termina por desprenderse en forma de agua y, en un sistema anaerobio, en forma de metano o de ácido sulfhídrico.

En el mecanismo de oxidación aromática el resultado es la producción de un compuesto del tipo ácido-cetoadípico, que se ve sometido posteriormente al mecanismo de β -oxidación hasta su total biodegradación, generando grupos acetato y succinato.

En moléculas de tensioactivo con grupos especiales, paralelamente o posteriormente a los mecanismos mencionados, también tienen lugar procesos de hidrólisis o desulfonación.

5.3.1 - Sulfonato de alquilbenceno lineal

Desde su introducción en el mercado, hace más de 40 años, hay una extensiva base de datos referente a la biodegradación del LAS en condiciones aeróbicas.

Una descripción detallada de la degradación aeróbica del LAS fue realizada por Swisher⁴³ y Schöberl⁶⁰. La mayoría de los estudios realizados en laboratorio indican que el proceso de biodegradación se inicia con la oxigenación de un grupo metilo terminal de la cadena alquílica, y la conversión del alcohol a un grupo carboxílico (ω -oxidación), originando los ácidos sulfofenilcarboxílicos (SPCs, del inglés *Sulfo Phenyl Carboxylic Acids*) como intermediarios de biodegradación.

Subsecuentemente a la ω -oxidación, ocurren sucesivas etapas de oxidación, llamadas de β -oxidación^{61,62}, que van promoviendo la fragmentación de la cadena alquílica eliminando 2 carbonos a la vez, resultando un SPC de cadena más corta. Después puede ocurrir la ruptura del anillo bencénico, siendo ésta considerada la etapa limitante

⁶⁰ Schöberl P., *Basic principles of LAS biodegradation*. Tenside Surf. Det. 26; 86-94, 1989.

⁶¹ Huddleston R.L., Allred R.C., *Microbial oxidation of sulfonated alkylbenzenes*. Dev. Ind. Microbial. 4; 24-38, 1963.

⁶² Swisher R.D., *Transient intermediates in the biodegradation of LAS*. J. Water Poll. Control Fed. 35; 1557-1564, 1963.

de todo el proceso de degradación. El mecanismo más aceptado responsable de esta ruptura es por formación del 4-sulfocatecol⁶³ ya que los microorganismos que degradan el LAS presentan altos niveles de la enzima 4-sulfocatecol 1,2 dioxigenasa⁶⁴.

Aunque la β -oxidación es la principal vía de destrucción de la cadena alquílica del LAS, también puede ocurrir la eliminación de carbonos a través de la α -oxidación, pero esta posibilidad ocurre en menor grado. Esta ruta alternativa fue postulada para intentar explicar el hallazgo del C₅-SPC como producto de degradación del C₁₂-LAS⁶⁵ y la detección de una amplia variedad de SPCs, tanto con cadena alquílica con número de carbonos impares y pares, como intermediarios durante la degradación del C₁₁-LAS⁶⁶.

La biodegradación completa del LAS concluye con la desulfonación de la molécula con total mineralización del compuesto en CO₂, H₂O, Na₂SO₄, y la incorporación de estas sustancias a la biomasa del ecosistema^{67,68}. Una de las evidencias de que la cadena alquílica y parte

⁶³ Schulz S., Dong W., Groth U., Cook A.M., *Enantiomeric degradation of 2-(4-sulfophenyl)butyrate via 4-sulfocatechol in Delfia acidovorans SPB 1*. Appl. Environ. Microbiol. 66; 1905-1910, 2000.

⁶⁴ Dong W., Radajewski S., Eichhorn P., Denger K., Knepper T.P., Murrell J.C., Cook A.M., *Parvibaculum lavamentivorans converts linear alkylbenzenesulphonate surfactant to sulphophenylcarboxylates, β -unsaturated sulphophenylcarboxylates and sulphophenyldicarboxylates, which are degraded in communities*. Appl. Environ. Microbiol. 96; 630-640, 2004.

⁶⁵ Baggi G., Catelani D., Colombi A., Galli E., Treccani V., *The microbial degradation of phenylalkanes: 1- and 2-phenyldodecane, 2- and 3-phenyldodecane-p-sulfonates*. Ann. Microbiol. Enzimol. 24; 317-323, 1974.

⁶⁶ Eggert C.R., Kaley R.G., Gledhill W.E., *Application of a laboratory freshwater lake model in the study of LAS biodegradation in: Proc. of the Workshop: Microbial Degradation of Pollutants in Marine Environments*, Bourquin AW, Eds. Pritchard PH, U.S. EPA Report 600/9-79-012, Bourquin, USA, pp. 451-461, 1979.

⁶⁷ Heinze J.E., Britton L.N., *Anaerobic Degradation: Environmental Relevance*. 3^o World Conference on Detergent. A. Cahn, AOCS, Champaign, USA, pp. 235-239, 1994.

del anillo aromático pertenecientes a la molécula del LAS puede biodegradarse en el medioambiente y convertirse en CO₂ fue presentada en un estudio que simulaba una estación de tratamiento de aguas residuales donde el LAS comercial empleado poseía carbonos marcados isotópicamente (¹⁴C) en el anillo aromático⁶⁹. En un estudio realizado anteriormente ya se había evidenciado qué partes de la molécula del LAS se podrían convertir en CO₂, también mediante el empleo del grupo fenilo marcado isotópicamente (¹⁴C)⁷⁰.

En la **Figura 1.16** se presenta de manera resumida el proceso de biodegradación aeróbica del LAS donde se puede observar una posible ruta de degradación. Para que esto ocurra es necesario distintas etapas y/o reacciones como: (I) ω-oxidación; (II) β-oxidación; (III) eliminación de la cadena alquílica con dioxigenación formando el 4-sulfocatecol; (IV) apertura del anillo bencénico; (V) desulfonación

En condiciones donde el oxígeno es limitante la biodegradación del LAS se produce mediante otro tipo de mecanismos que no se conocen en profundidad. Bajo estas condiciones la biodegradación se da con mayor dificultad.

⁶⁸ Karsaand D.M. Porter M.R., *Biodegradability of surfactants*, Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall, London, UK, 1995.

⁶⁹ Nielsen A.M., Huddleston R.L., *Ultimate biodegradation of LAS alkyl and ring carbon*. Dev. Ind. Microbiol. 22; 415-424, 1981.

⁷⁰ Gledhil W.E., *Screening test for assessment of ultimate biodegradability: linear alkylbenzene sulfonates*. Appl. Microbiol. 30; 922-929, 1975.

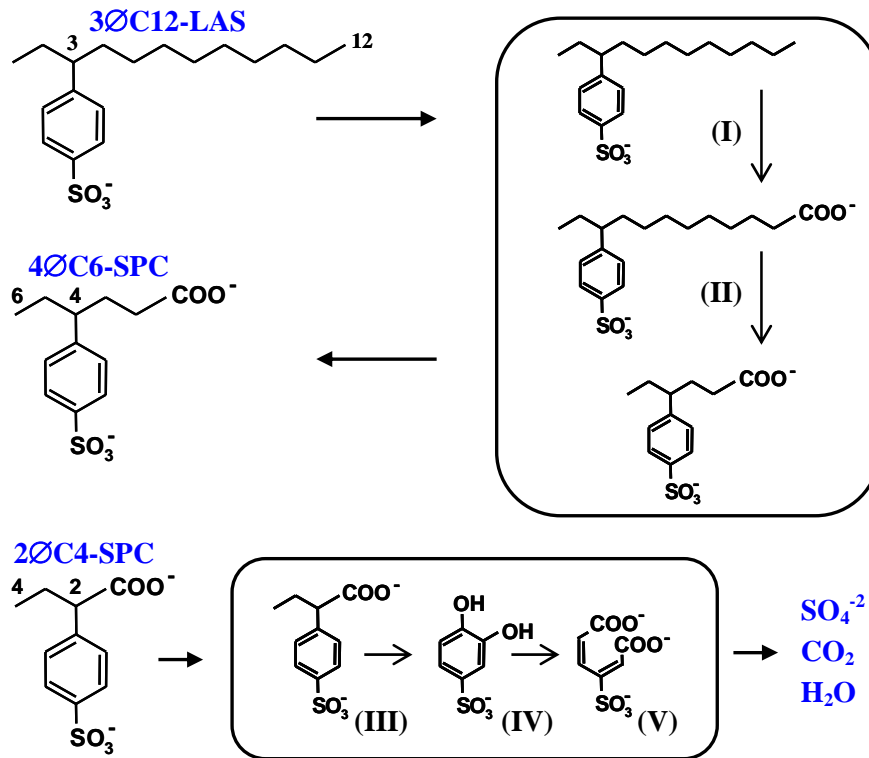


Figura 1.16 - Proceso de biodegradación aeróbica del LAS

5.3.2 - Alquilfenoles etoxilados

Han sido numerosos los estudios dedicados a la elucidación de la ruta de biodegradación seguida por los alquilfenoles etoxilados, siendo la más aceptada la propuesta por Yoshimura⁷¹.

En el caso de los APEO, a diferencia de lo que ocurre con los AEO, algunos autores proponen que no existe evidencia de hidrólisis en el

⁷¹ Yoshimura K., *Biodegradation and fish toxicity of non-ionic surfactant*, J. Am. Oil Chem. Soc. 63; 1590-1596,1986.

enlace éter-fenol para dar lugar a polietilenglicol y alquilfenol, debido probablemente a factores estéricos. Sí existen evidencias de que la cadena etoxilada se acorta un mol de etilenglicol en cada paso⁷² permaneciendo unida al resto hidrófobo. Este acortamiento parece ser meramente hidrolítico, liberando etilenglicol.

Otros autores afirman que en las condiciones de un ensayo de simulación mediante fangos activados, los APEO siguen un mecanismo de ω -oxidación de la cadena etoxilada y otro de división central⁷³. Como resultado de estas rutas se forman alquilfenoles (AP), alquilfenoles mono y di-etoxilados (AP₁EO, AP₂EO, compuestos persistentes) y polietilenglicol mono y di-carboxilado respectivamente

La oxidación de la cadena hidrofóbica fue puesta de manifiesto por Osburn y colaboradores⁷⁴, encontrando evidencias de que ésta podía oxidarse originando alquilfenoles etoxicarboxilados, aunque no parece ser este el mecanismo principal de degradación de los APEO.

Para el NPEO se han propuesto dos posibles rutas de biodegradación, esquematizadas en la **Figura 1.17**.

⁷² Shroder H., *Surfactants: non-biodegradable, significant pollutants in sewage treatment plant effluents*. J. Chrom. A 647; 219-234, 1993.

⁷³ Franska M., Franski R., Szymanski A., Lukaszewski Z., *A central fission pathway in alkylphenol ethoxylate biodegradation*. Water Research 37; 1005-1014, 2003.

⁷⁴ Osburn Q., Benedict J., *Polyethoxylated alkylphenols: relationship of structure biodegradation mechanism*. J. Am. Oil Chem. Soc. 43; 141-146, 1966.

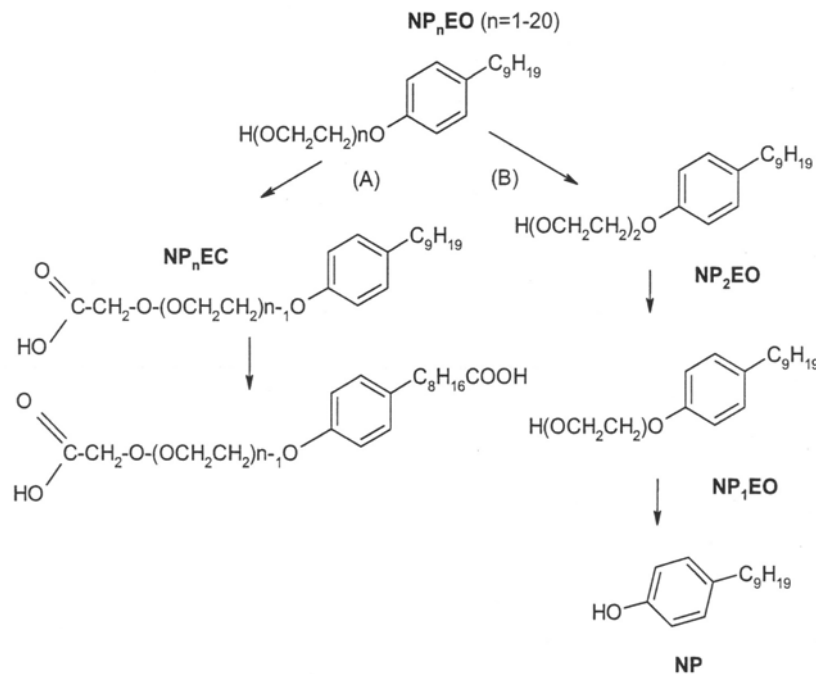


Figura 1.17 - Proceso de biodegradación del NPEO

En la ruta hidrolítica oxidativa (A), los principales metabolitos son los ácidos alquilfenoxiacéticos, seguidos de los metabolitos doblemente oxidados⁷⁵. De la ruta hidrolítica no oxidativa (B), resultan cadenas cortas de NPEO: NP_1EO (Nonilfenol monoetoxilado), NP_2EO (Nonilfenol dietoxilado) y NP (Nonilfenol). Esta es la ruta principal que aparece en agua de mar y sedimentos.

Los NPEO y sus ácidos carboxílicos son relativamente hidrofílicos, por lo que tienen una escasa tendencia a adsorberse en las partículas durante su tratamiento en depuradoras, y por lo tanto, pueden permanecer

⁷⁵ Jonkers N., Laane R., de Graaf C., Voogt P., *Fate modelling of Nonylphenol Ethoxylates and their metabolites in the Dutch Scheldt and Rhine estuaries: validation with new field data*. Estuarine Coastal and Shelf Science 62; 141-160, 2005.

predominantemente en solución antes de ser degradados. El NP, NP₁EO y NP₂EO son más hidrofóbicos, por tanto, tenderán a adsorberse en las partículas, encontrándose en grandes cantidades en los lodos de las EDARs⁷⁶.

Por tanto las rutas metabólicas de los APEO conducen a la formación de biointermedios que resultan ser persistentes y más tóxicos que los compuestos de partida^{77,78}.

5.3.3 - Alcoholes etoxilados

La influencia de parámetros tales como la longitud de la cadena etoxilada y la posición del enlace con la cadena hidrofóbica, han sido estudiados en numerosas ocasiones. Patterson y colaboradores⁷⁹ propusieron dos posibles mecanismos que ocurrirían simultáneamente durante la degradación de los alcoholes etoxilados: una fisión de la molécula en dos entidades, una hidrófoba y otra hidrófila, y una oxidación rápida del grupo hidrofóbico.

⁷⁶ Ahel M., *Behaviour of alkylphenolpoly-ethoxylate surfactants in mechanical-biological sewage treatment*. Water Science Technology 19; 449-460, 1987.

⁷⁷ Ahel M., Giger W., Molnar E., Ibrié S., *Determination of nonylphenol polyethoxylates and their lipophilic metabolites in sewage effluents by normal-phase high-performance liquid chromatography and fluorescent detection*. Croatica Chemica Acta 73; 209-227, 2000.

⁷⁸ Fujita M., Ike M., Mori K., Haku H., Sakaguchi Y., Asano M., Maki H., Nishihara T., *Behaviour of nonylphenol ethoxylates in sewage treatment plants in Japan-biotransformation and ecotoxicity*. Water Science Technology 42; 23-30, 2000.

⁷⁹ Patterson S.J., Scout C.C., Tucker B.E., *Nonionic detergent degradation: III. Initial mechanism of degradation*. J. Am. Oil Chem. Soc 47; 37-41, 1970.

Otros autores, como Marcomini y colaboradores⁸⁰ propusieron tres mecanismos distintos para la biodegradación aerobia de alcoholes etoxilados: una escisión central de la molécula, un ataque microbiano al carbono terminal de la cadena alquílica a través de una ω,β -oxidación, y un ataque primario al carbono terminal de la cadena polietoxilada mediante un proceso hidrolítico similar al que muestran los tensioactivos no iónicos del tipo alquilfenol polietoxilado.

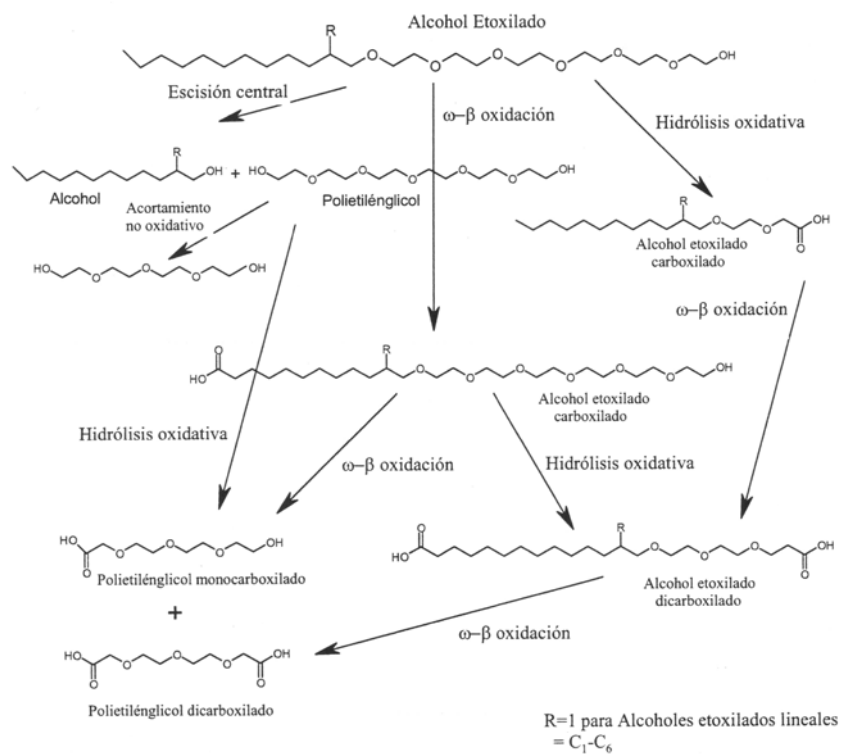


Figura 1.18 - Proceso de biodegradación del alcohol etoxilado

⁸⁰ Marcomini A., Zanette M., Lojana G., Suter M.J., *Behaviour of aliphatic alcohol polyethoxylates and their metabolites under standardized aerobic biodegradation conditions*. Environmental Toxicology and Chemistry 19; 549-554, 2000.

El mecanismo de escisión central conduce a la formación de polietilenglicol con la misma longitud que la cadena etoxilada, alcoholes grasos y posteriormente ácidos grasos resultantes del resto alquílico. Las moléculas de polietilenglicol se degradan posteriormente mediante un mecanismo hidrolítico y/o hidrolítico oxidativo con la consiguiente formación de polietilenglicol mono o di-carboxilado.

El mecanismo de ataque al carbono terminal de la cadena alquílica implica una ω -oxidación, que origina el alcohol etoxilado carboxilado, seguida de una serie de β -oxidaciones, que conducen a la formación de polietilenglicol monocarboxilado.

El mecanismo de ataque primario al carbono terminal de la cadena polietoxilada tiene lugar mediante una serie de acortamientos de la cadena polietoxilada, que conducen a la formación de polietilenglicol dicarboxilado.

La escisión y oxidación de la cadena alquílica son mecanismos que han sido propuestos para la biodegradación de alcoholes etoxilados lineales, mientras que la biodegradación primaria a través del ataque a la cadena polietoxilada ha sido propuesta para alcoholes etoxilados ramificados⁸⁰.

En los ensayos de biodegradación que simulan una planta de tratamiento de aguas residuales, el mecanismo de escisión central, que es el dominante, se produce independientemente de las diferencias existentes

en la cadena alquílica del AEO, de la longitud de la cadena etoxilada, del tipo de fango, tipo de planta y tiempo de retención hidráulico⁸¹.

5.4 Relación entre estructura y biodegradabilidad

Debido a la enorme importancia económica de los tensioactivos y a su contribución al deterioro ambiental si estos persisten en el medio, se han desarrollado numerosos estudios encaminados a establecer las características estructurales que gobiernan la susceptibilidad de estos compuestos a ser biodegradados.

5.4.1 - Sulfonatos de alquilbenceno lineales

La biodegradación primaria de los diferentes homólogos del LAS, en general, aumenta a medida que lo hace la longitud de la cadena alquílica⁴³. De la misma forma, para distintos isómeros, la degradación es más rápida a medida que aumenta la distancia entre el grupo sulfonilo y el extremo metilo terminal de la cadena. Este efecto se conoce como *principio distancia*³⁶.

Sin embargo, hay excepciones a estas reglas generales, y parece ser que los factores determinantes de las velocidades relativas de degradación son complejos⁸². Entre ellos están:

⁸¹ Szymanski A., Wyras B., Zbigniew S., Jaroszynski T., Lukaszewski Z., *Biodegradation of fatty Alcohol Ethoxylates in the continuous flow activated sludge test*. Wat. Res. 34; 4101-4109, 2000.

- La concentración de los isómeros y homólogos del LAS
- Los posibles efectos inhibitorios del LAS
- La presencia de otros homólogos e isómeros
- La concentración de sólidos en suspensión
- El grado de aclimatación del inóculo

Tras numerosos estudios Hammerton^{83,84} sugirió que el factor principal, no sólo en la velocidad de biodegradación, sino también en la extensión de la misma, era la linealidad del grupo hidrófobo, y que la naturaleza química, además del modo de ataque a este grupo, eran factores de menor importancia. Se llegó por tanto a la conclusión de que tensioactivos lineales como el LAS eran fácilmente degradables mientras que los ramificados no.

De forma general, se pueden establecer las siguientes conclusiones en cuanto a la relación entre estructura química y biodegradabilidad para tensioactivos aniónicos:

- La naturaleza del grupo hidrófilo no tiene excesiva importancia en el proceso. En igualdad de condiciones, los más biodegradables son los que poseen grupo carboxílico,

⁸² Perales J.A., *Variabilidad de la biodegradación y toxicidad de compuestos xenobióticos en el medio marino. Aplicación a Lineal Alquilbenceno Sulfonatos en aguas del golfo de Cádiz*. Tesis Doctoral 2001. Departamento de Ingeniería Química, Tecnología de Alimentos y Tecnologías del Medio Ambiente. Universidad de Cádiz.

⁸³ Hammerton C. *The decay of synthetic anionic detergents in natural waters*. J. Appl. Chem. 5; 517-524, 1955.

⁸⁴ Hammerton C. *Synthetic detergents and water supplies. Part II. The chemical constitution of anionic surface active compounds and their susceptibility biochemical oxidation*. Proceedings of the Society for Water Treatment and Examination 5, 145-174, 1956.

seguidos de los del grupo sulfato y por último los del grupo sulfonato.

- Cuanto mayor sea la distancia entre el grupo hidrófilo y el extremo final de la cadena, mayor es la biodegradabilidad (*principio de distancia*).
- El principal factor que determina la biodegradabilidad es la estructura del grupo hidrófobo, disminuyendo a medida que aumenta el grado de ramificación. Sin embargo, si la ramificación de la cadena esta próxima al grupo hidrófilo, el tensioactivo es degradado a pesar de ser ramificado. Esto es debido a que las bacterias atacan al tensioactivo empezando por el extremo opuesto al grupo hidrófilo, paralizándose el ataque cuando llegan a un carbono terciario.

5.4.2 - Alquilfenoles etoxilados

En estos tensioactivos se pueden diferenciar tres elementos estructurales: la cadena alquímica, el grupo aromático y la cadena polietoxilada. A continuación se describe de qué forma influye cada uno de estos elementos en la biodegradación de los APEO:

- **La cadena alquímica:** La biodegradabilidad de los APEO viene determinada principalmente por la cadena alquímica, obteniéndose porcentajes de biodegradación menores en el caso de que la cadena sea ramificada. Estudios realizados por

Kravetz y colaboradores⁸⁵ sobre la influencia de la estructura del grupo hidrófobo y su longitud en la biodegradación de los APEO, llegan a las siguientes conclusiones:

- Los APEO lineales son más biodegradables que los ramificados.
 - Cuanto mayor es el grado de ramificación de la cadena alquílica, más lentamente y en menor extensión ocurre el proceso de biodegradación.
 - A elevadas concentraciones de tensioactivo o baja temperatura, la extensión de la biodegradación disminuye considerablemente con respecto a las condiciones normales de operación.
-
- **El grupo aromático:** La presencia de un grupo aromático afecta negativamente a la biodegradación⁴⁷. La posición de la cadena alquílica en el anillo bencénico influye en la velocidad de degradación de forma que ésta es mayor cuando el grupo aromático está unido al carbono primario de la cadena alquílica⁸⁶.
 - **La cadena polietoxilada:** La velocidad de degradación de los APEO está influenciada por el número de unidades etoxiladas de forma que un incremento en el número de unidades provoca una disminución de la velocidad de degradación. La longitud

⁸⁵ Kravetz L., Salanitro J.P., Dorn, P.B., Guin K.F., *Influence of hydrophobe type and extent of branching on environmental response factors of nonionic surfactants*. J. Am. Oil Chem. Soc. 68; 610-618, 1991.

⁸⁶ Little A.D., *Human safety and environmental aspects of mayor surfactants*. The Soap and Detergent Association New Cork. A. D. Little Inc. Cambridge. Reino Unido, 1977.

de cadena necesaria para que tenga lugar la inhibición depende de la relación cadena etoxilada/cadena alquílica, es decir, de su balance hidrófilo/lipófilo⁸⁷.

5.4.3 - Alcoholes etoxilados

El factor que afecta de forma más importante a la biodegradabilidad de alcoholes etoxilados es la estructura hidrófoba, y en particular, la linealidad del esqueleto carbonado, que tiene una influencia mayor que otros factores tales como la longitud de la cadena alquílica, el tipo de enlace a la cadena etoxilada y su longitud.

Los alcoholes etoxilados lineales se caracterizan como *fácilmente biodegradables*. La biodegradación primaria es usualmente rápida y completa. La biodegradación final medida como consumo de oxígeno, o mediante otro procedimiento adecuado, suele ser bastante extensa⁴³.

El efecto de la ramificación de la cadena alquílica sobre la biodegradación se ha demostrado claramente por la comparación de un AEO lineal C₁₂-C₁₅ de 9 EO con un alcohol altamente ramificado C₁₃ con 7 EO. El alcohol graso etoxilado lineal alcanzó valores superiores al 80 % de biodegradación en 28 días, en cambio, el alcohol etoxilado ramificado alcanzó únicamente un 40 % de biodegradación⁸⁵. Además, algunos estudios demostraron que la facilidad de biodegradación de

⁸⁷ Dobarganes M.C., *Estudios sobre la biodegradabilidad de agentes tensioactivos no iónicos*. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla, 1975.

alcoholes etoxilados ramificados aumenta con el número de unidades etoxi en la molécula⁸⁸.

Bajo condiciones anaerobias, la biodegradación de los alcoholes etoxilados presenta comportamientos diferenciados en función del tamaño de cadena carbonada y del número de unidades etoxi⁸⁹.

⁸⁸ Siegfried M., Baumann W., *Biological degradability of alcohol ethoxylates*. *Parfuemerie und Kosmetik* 74; 692-698, 1993.

⁸⁹ Mezzanotte V., Bolzacchini E., Orlando M., Rozzi A., Rullo S., *Anaerobic removal of linear alcohol ethoxylates*. *Bioresource Technology* 82; 151-156, 2002.

6.- LEGISLACIÓN

La evolución legislativa sobre los tensioactivos va íntimamente unida a la problemática que surge como consecuencia de su consumo y, entre otros, está muy influenciada por dos hechos medioambientales fundamentales: la aparición tanto de espumas persistentes como de metabolitos de elevada toxicidad.

Así, desde que en Alemania se fabricó el primer detergente sintético, la industria fomentó la producción de este tipo de compuestos rebajando costes, para introducirlos en un mercado cada vez con mayor demanda y más competitivo. Su uso creciente en formulaciones comerciales determinó que en la década de los 50 comenzaran a surgir problemas ambientales de contaminación por la aparición de espumas en ríos, depuradoras y en aguas subterráneas.

Sin embargo pronto se puso de manifiesto que el uso de otros compuestos de carácter detergente entre los que figuraban los tensioactivos no iónicos nonilfenol etoxilado y octilfenol etoxilado, en su proceso de biodegradación producían metabolitos como el nonilfenol y el octilfenol que aunque no eran formadores de espuma, poseían carácter estrogénico y, por tanto, se trataba de derivados de mayor toxicidad que los compuestos originales. Este hecho determinó que se fuese más exigente con el concepto de biodegradabilidad y se tuviese que distinguir entre biodegradabilidad primaria y biodegradabilidad final o mineralización.

La preocupación de los diferentes gobiernos ante estas problemáticas determinó que comenzaran a aparecer legislaciones que limitaban el uso

de estos tensioactivos duros. La primera regulación se promulgó en Alemania en 1961 y exigía que la biodegradación de los tensioactivos aniónicos fuese del 80 % (biodegradación primaria). Con la creación de la Comunidad Económica Europea y posteriormente de la Unión Europea, se intentó armonizar las diferentes legislaciones. Así, han aparecido sucesivamente distintas directivas, regulaciones y decisiones de obligado cumplimiento para todos los estados miembros. Estas normativas han ido resolviendo los problemas medioambientales conforme se ponían de manifiesto y regulaban el uso de los detergentes en todos los estados miembros. Así, hasta 2004 se promulgaron un gran número de leyes, entre las que se pueden citar a modo de ejemplo las siguientes:

- **Directiva 73/404/CEE**, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materia de detergentes.
- **Directiva 73/405/CEE**, referente a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros relativas a los métodos de control de la biodegradabilidad de los tensioactivos aniónicos.
- **Directiva 82/242/CEE**, referente a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros relativas a los métodos de control de la biodegradabilidad de los tensioactivos no iónicos.

- **Directiva 82/243/CEE**, que modifica la Directiva 73/405/CEE referente a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros relativas a los métodos de control de la biodegradabilidad de los tensioactivos aniónicos.
- **Directiva 86/94/CEE**, por la que se modifica la Directiva 73/404/CEE referente a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materia de detergentes.

Por motivos de claridad y racionalidad, dichas normas en 2004 han sido actualizadas y refundidas en un sólo texto: **REGLAMENTO (CE) N° 648/2004**⁹⁰, de 31 de marzo de 2004, sobre detergentes y que actualmente está en vigor. Este reglamento establece normas destinadas a lograr la libre circulación de detergentes y tensioactivos para detergentes en el mercado europeo, garantizando al mismo tiempo una elevada protección del medio ambiente y de la salud humana. A estos efectos, el presente reglamento armoniza algunas normas de comercialización de estas sustancias en lo referente a la biodegradabilidad; a las restricciones o prohibiciones por motivos de biodegradabilidad; al etiquetado adicional de los detergentes; a la información que los fabricantes deben tener a disposición de las autoridades competentes y del personal médico de los Estados miembros. Además establece una nueva definición de detergente que se amplía, y una serie de condiciones, características y límites que estas sustancias deben presentar para su correcta comercialización. La principal novedad es el requerimiento de biodegradación final como necesaria para estipular la limitación de su comercialización. Otra de las

⁹⁰ CEE (2004). Reglamento del Parlamento Europeo y del Consejo de la Unión Europea 648/2004/CE, sobre detergentes (DO L 104 de 08/04/2004).

novedades es que establece los métodos de ensayos y analíticos para evaluar la biodegradabilidad final de todos los tensioactivos: aniónicos, no iónicos, catiónicos y anfotéricos (estos dos últimos contemplados por primera vez).

Recientemente, ha sido modificado en sus anexos III y VII en lo referente a los métodos de ensayos de biodegradación final y a normas de etiquetado e informaciones sobre sus ingredientes por el **REGLAMENTO (CE) N° 907/2006**⁹¹, de 21 de junio de 2006.

⁹¹ CEE (2006). Reglamento n° 907/2006 de la Comisión, de 20 de junio de 2006, por el que se modifica el Reglamento (CE) n° 648/2004, sobre detergentes, con el fin de adaptar sus anexos III y VII (DO L 168 de 21/06/2006).

7.- MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS SULFOFENILCARBOXÍLICOS, ALQUILFENOLES Y ALQUILFENOLES ETOXILADOS Y ALCOHOLES ETOXILADOS.

En este apartado se resume la diferente metodología publicada en las últimas décadas para la determinación de estos analitos en diferentes tipos de matrices, principalmente medioambientales.

7.1 Ácidos sulfofenilcarboxílicos

La determinación de los principales metabolitos del LAS se ha llevado a cabo mediante el empleo de técnicas analíticas de naturaleza diversa: espectroscopía infrarroja y resonancia magnética nuclear; cromatografía de gases con espectrometría de masas; cromatografía de líquidos con detección UV (LC-UV); cromatografía líquida con detección fluorescente (LC-FD); electroforesis capilar con detección UV (CE-UV) y de masas (CE-MS), e inmunoensayo. En la mayoría de los casos se requiere una etapa previa de preconcentración de los analitos y/o purificación de las muestras debido a las bajas concentraciones a las que suelen encontrarse y a la complejidad de las muestras.

En la **Tabla 1.5** se recogen las diferentes metodologías utilizadas para la determinación de SPCs.

Tabla 1.5. Análisis de SPCs en distintas matrices ambientales.

Analitos	Matriz	Técnica analítica	LD (ng·mL ⁻¹)	Ref.
C ₃ , C ₆ , C ₈ , C ₁₀	Aguas residuales y aguas subterráneas	IR, ¹ H NMR, ¹³ C NMR	Identificación	92
1C ₁₂ LAS, SPC (C ₂ , 3C ₃ , 4C ₄ , 5C ₅ , 6C ₆ , 7C ₇), metabolitos sin sulfonar	Aguas naturales	LC-UV	20	93
SPC (C ₇ -C ₁₃)	Agua de marisma	LC-FD (LAS) LC-UV (LAS + SPC) LC-MS (SPC)	Identificación	94
LAS (C ₁₀ -C ₁₃) SPC (2C ₄)	Aguas residuales, Agua de río	GC-MS	0.01	95
LAS (2C ₁₂) SPC (3C ₄)	Pescado, Agua	LC-FD	2 ng/mg 30	96
LAS (C ₁₀ -C ₁₃) SPC (C ₄ -C ₁₃)	Agua de mar, Sedimentos, Aguas intersticiales	LC-FD	0.5-1	97
LAS (C ₁₀ -C ₁₃) SPC (C ₆ -C ₁₂)	Agua de lago	LC-MS	Identificación	98

- ⁹² Field J.A., Leenheer J.A., Thorn K.A., Barber II L.B., Rostad C., Macalady D.L., Daniel S.R., *Identification of persistent anionic surfactant-derived chemicals in sewage effluent and groundwater*. J. Contam. Hydrol. 9; 55-78, 1992.
- ⁹³ Sarrazin L., Arnoux A., Rebouillon P., *High-performance liquid chromatographic analysis of a linear alkylbenzenesulfonate and its environmental biodegradation metabolites*. J. Chrom. A 760; 285-291, 1997.
- ⁹⁴ González-Mazo E., Honing M., Barceló D., Gómez-Parra A., *Monitoring long-chain intermediate products from the degradation of linear alkylbenzene sulfonates in the marine environment by solid-phase extraction followed by liquid chromatography/ion spray mass spectrometry*. Environ. Sci. Technol. 31; 504-510, 1997.
- ⁹⁵ Ding W.H., Lo J.H., Tzing S.H., *Determination of Linear Alkylbenzenesulfonates and their degradation products in water samples by Gas Chromatography with ion-trap Mass Spectrometry*. J. Chrom. A 818; 270-279, 1998.
- ⁹⁶ Tolls J., Haller M., Sijm D., *Extraction and isolation of linear alkylbenzenesulfonate and its sulfophenylcarboxylic acid metabolites from fish samples*. Anal. Chem. 71; 5242-5247, 1999.
- ⁹⁷ León V.M., González-Mazo E., Gómez-Parra A., *Handling of marine and estuarine samples for the determination of Linear Alkylbenzene Sulfonates and Sulfophenylcarboxylic Acids*. Journal of Chrom. A 889; 211-219, 2000.
- ⁹⁸ Eichhorn P., Flavier M.E., Paje M.L., Knepper T.P., *Occurrence and fate of linear and branched alkylbenzenesulfonates and their metabolites in surface waters in the Philippines*. Sci. Total Environ. 269; 75-85, 2001.

Tabla 1.5. Análisis de SPCs en distintas matrices ambientales. (cont.)

Analitos	Matriz	Técnica analítica	LD (ng·mL ⁻¹)	Ref.
LAS (C ₁₀ -C ₁₃) SPC (C ₂ -C ₁₃)	Aguas residuales	CE-MS	Identificación	⁹⁹
LAS (C ₁₀ -C ₁₃) SPC (C ₂ -C ₅ , C ₈ , C ₁₀ , C ₁₁)	Aguas residuales Fangos	LC-MS	0.03-1.5	¹⁰⁰
LAS (C ₁₀ -C ₁₃) SPC totales	Aguas residuales Aguar de río	LC-UV	Identificación	¹⁰¹
LAS (C ₁₀ -C ₁₄) SPC (C ₃ -C ₆ , C ₈ -C ₁₃)	Aguas de estuario Agua de mar	LC-FD	0.5-1	¹⁰²
SPC (2C ₃ , 2C ₄ , 3C ₄ , 2C ₅ , 3C ₅ , 3C ₆)	Agua	Inmunoanálisis	0.15	¹⁰³

⁹⁹ Riu J., Barceló D., *Determination of Linear Alkylbenzene Sulfonates and their polar carboxylic degradation products in sewage treatment plants by automated Solid-Phase Extraction followed by Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry*. The Analyst 126; 825-828, 2001.

¹⁰⁰ Riu J., Martínez E., Barceló D., Ginebreda A., Tirapu Ll., *LC-MS determination of Linear Alkylbenzene Sulfonates and their carboxylic degradation products in influent and effluent water samples and sludges from sewage-treatment plants*. Fresenius J. Anal. Chem. 371; 448-455, 2001.

¹⁰¹ Akyuz M., Roberts D.J., *Determination of Linear Alkylbenzene Sulphonates and their biodegradation intermediates by isocratic RP-HPLC*. Turk. J. Chem. 26; 669-679, 2002.

¹⁰² León V.M., Sáez M., Gonzalez-Mazo E., Gómez-Parra A., *Occurrence and distribution of Linear Alkylbenzene Sulfonates and Sulfophenylcarboxylic Acids in several Iberian littoral ecosystems*. Sci. Total Environ. 288; 215-226, 2002.

¹⁰³ Estévez M.C., Galve R., Sanchez-Baeza F., Marco M.P., *Direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of the highly polar short-chain sulfophenyl carboxylates*. Anal. Chem. 77; 5283-5293, 2005.

7.2 Alquilfenoles Etoxilados y Alquilfenoles

Debido a la preocupación generada por la persistencia y posibilidad de efectos estrogénicos de alquilfenoles, alquilfenoles mono- y di-etoxilados y a que éstos son los principales productos de degradación de los tensioactivos alquilfenoles etoxilados, estos tensioactivos y sus productos de degradación han sido ampliamente estudiados. A continuación se comentan algunas referencias de los métodos analíticos encontrados en bibliografía.

7.2.1 - Espectrometría de absorción molecular UV-Vis (colorimetría)

Los primeros métodos para intentar determinar tensioactivos no iónicos a los niveles que pudiesen aparecer en muestras medioambientales fueron métodos no específicos como la colorimetría.

Estos métodos se basan en la formación de complejos donores-aceptores. Así los ácidos de Lewis fuertes como son los cationes alcalinos y alcalinotérreos, forman complejos de coordinación catiónicos con las cadenas polietoxiladas de los tensioactivos no iónicos. Como contraiones pueden actuar aniones de gran tamaño como el tetraiodobismutato o el tetratiocianocobaltato. Las propiedades de estos aniones son entonces utilizadas para la etapa de determinación final.

El procedimiento BiAS (Bismuth Active Substances) fue usado por Wickbold y colaboradores^{104,105,106}, que emplearon tetraiodobismutato de bario para formar un precipitado naranja con tensioactivos no iónicos en disoluciones moderada/fuertemente ácidas. Este precipitado es disuelto entonces con una disolución de tartrato amónico y los iones bismuto liberados se determinan mediante colorimetría, potenciometría¹⁰⁷ o mediante espectroscopía de rayos X¹⁰⁸. Pero este procedimiento falla en la determinación de APEO con menos de 5 unidades etoxilados debido a que estos compuestos no precipitan¹⁰⁹.

Otro procedimiento que fue ampliamente utilizado en la determinación de tensioactivos no iónicos fue el CTAS (cobalt thiocyanate active substances). En este procedimiento, los tensioactivos no iónicos reaccionan con el tetratiocianatocobaltato de amonio en disolución acuosa para dar lugar a complejos insolubles en agua de color azul, que son fácilmente extraíbles con diclorometano¹¹⁰ o benceno¹¹¹.

¹⁰⁴ Wickbold R., *Enrichment and separation of surfactants from surface waters through transport in the gas/water interface*. Tenside Surf. Det. 8; 61-63, 1971.

¹⁰⁵ Wickbold R., *On the Determination of non-ionic surfactants in river water and sewage*. Tenside Surf. Det. 9; 173-177, 1972.

¹⁰⁶ Wickbold R., *The analytic determination of small amounts of nonionic surfactants*. Tenside Surf. Det. 10; 179-180, 1973.

¹⁰⁷ Waters J., Longman G.F., *A colorimetric modification of the wickbold procedure for the determination of non ionic surfactants in biodegradation test liquors*. Anal. Chim. Acta 93; 341-344, 1977.

¹⁰⁸ Hellmann, H., *Zur Bestimmung von nichtionischen Tensiden in Wasser und Abwasser durch Röntgenfluoreszenz und IR-Spektroskopie*. Fresenius Z Anal. Chem. 297; 102-106, 1979.

¹⁰⁹ Stephanou, E., Giger, W., *Persistent organic chemicals in sewage effluents. 2. Quantitative determinations of nonylphenols and nonylphenol ethoxylates by glass capillary gas chromatography*. Environ. Sci. Technol. 16; 800-805, 1982.

¹¹⁰ Boyer S.L., Guin K.F., Kelley R.M., Mausner M.L., Robinson H.F., Schmitt T.M., Stah C.R., Setzkorn E.A., *Analytical method for nonionic surfactants in laboratory degradation and environmental studies*. Environ. Sci. Technol. 11; 1167-1171, 1977.

¹¹¹ Nozawa A., Ohnuma T., Sekine T., *Re-examination of the microanalysis of non-ionic surfactants that contain polyoxyethylene chains by the method involving solvent extraction of the thiocyanatocobaltate(II) complex*. Analyst 101; 543-548, 1976.

De nuevo éste método tiene la limitación de requerir un número mínimo de 6 unidades etoxiladas para dar lugar a la formación del complejo coloreado. Además pueden aparecer interferencias importantes por parte de tensioactivos catiónicos presentes en el medio. Por tanto, se hace necesaria una etapa previa de separación antes de la formación del complejo.

El procedimiento CTAS presenta ciertas ventajas sobre el BiAS como involucrar menos etapas en la preparación de la muestra así como ser más fácil de desarrollar.

Se han empleado otras sales para la formación de complejos con tensioactivos no iónicos¹⁰⁶. Sin embargo, ninguno de ellos ha tenido una aplicación comparable al BiAS o CTAS.

7.2.2 - Espectrometría IR y RMN

La espectrometría IR se ha empleado para la identificación cualitativa de tensioactivos no iónicos y para la diferenciación entre éstos y compuestos no tensioactivos. En primer lugar, para obtener un espectro legible es necesaria una separación de los compuestos orgánicos en diferentes fracciones. Esto suele llevarse a cabo mediante cromatografía en capa fina o mediante una columna cromatográfica de gel de sílice. La apariencia general de un espectro de IR de APEO y AEO es muy similar, con una banda intensa a 1101 cm^{-1} , característica de la vibración -C-O-C-. La única diferencia clara entre ellos es el pico agudo debido al anillo aromático presente en los APEO que aparece a 1609 y 1512 cm^{-1}

y que puede usarse para la identificación de éstos en muestras ambientales^{112,113}.

La espectrometría de RMN es usada normalmente para la caracterización de tensioactivos no iónicos en relación a su estructura molecular. Su aplicación a la determinación de APEO en muestras ambientales es muy raro debido que las concentraciones en las que se encuentran no suelen ser suficientes para RMN y también debido a la falta de sustancias de referencia puras.

7.2.3 - Cromatografía de Líquidos

Los tensioactivos comerciales de APEO son mezclas complejas consistentes en varios homólogos y oligómeros que difieren en la longitud de su cadena alquílica y el número de unidades etoxiladas. Consecuentemente la separación de APEO en sus componentes individuales es un problema bidimensional que se ha resuelto tradicionalmente usando distintas fases estacionarias: las fase polares (cromatografía en **fase normal**) permiten la separación de APEO atendiendo a su número de unidades etoxiladas; y las fases no polares (cromatografía en **fase reversa**) permiten la separación de APEO atendiendo a la longitud de su cadena hidrofóbica, eluyendo todos los etoxímeros en un pico simple. El anillo cromóforo de los APEO permite determinarlos de forma sensible y directa mediante detección UV o

¹¹² Jones P., Nickless G., *Characterization of non-ionic detergents of the polyethoxylated type from water systems. II. Isolation and examination of polyethoxylated material before and after passage through a sewage plant.* J. Chrom. A 156; 99-110, 1978.

¹¹³ Hellmann H., *Pseudo-Niotenside in Gewässern = Pseudo-agents de surface non ioniques dans les eaux de surface Nonionic pseudo-surfactants in surface waters.* Vom Wasser 64; 29-42, 1985.

fluorescente. Por consiguiente, la cromatografía líquida tanto en fase normal como en fase reversa, es una técnica adecuada para el análisis de APEO y sus metabolitos en medio ambiente.

La cromatografía en fase normal es mayoritariamente aplicada para obtener información acerca de la distribución de las unidades etoxiladas y se ha aplicado a determinaciones cuantitativas de APEO en muestras de aguas residuales, fangos, y distintos medios acuáticos, revelando los cambios en la composición de APEO debido a su biodegradación.

Debido a la falta de estándares de APEO con un número discreto de unidades etoxiladas, la cuantificación de APEO y AP en fase reversa se lleva a cabo habitualmente a través del método del patrón interno o patrón externo, usando los factores de respuesta generados por patrones adecuados.

La cromatografía en fase reversa es usada como una técnica complementaria a la cromatografía en fase normal, siendo capaz de separar los homólogos OPEO y NPEO, pero coeluyendo generalmente los etoxímeros.

Pero sin duda es la Cromatografía Líquida acoplada a detección de masas la que proporciona los métodos más sensibles y selectivos para el análisis de APEO. Así se han llevado a cabo el análisis en aguas residuales, aguas de río y agua potable¹¹⁴ con límites de detección entre 0.6 y 0.0002 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

¹¹⁴ Crescenzi C., Di Corcia A., Samperi R., Marcomini A., *Determination of nonionic Polyethoxylate surfactants in environmental waters by Liquid Chromatography/Electrospray Mass Spectrometry*. Anal. Chem. 67; 1797-1804, 1995.

En la **Tabla 1.6** aparecen algunas de las referencias encontradas en bibliografía para la determinación de AP y APEO mediante cromatografía líquida con distintos tipos de detección.

Tabla 1.6. Análisis de APEO mediante cromatografía líquida.

Analitos	Matriz	Columna	Detección	Límite de Detección	Ref
APEO	Agua dopada	Bondapak C ₁₈ 120 x 2 mm	UV (280 nm)		115
NPEO	Agua de depuradora Agua potable	Alltech C ₈ 250 x 2.1 mm	ES-MS (modo positivo)	0.0002-0.6 µg·L ⁻¹	
APEO	Mezcla comercial	Zorbax-NH ₂ 250 x 4.6 mm LiChrosorb-NH ₂ 500 x 4.6 mm	UV (276 nm)		116
APEO	Mezcla comercial	LiChrosorb Si 60 150 x 4 mm	UV-FD (280/310 nm)	0.2 µg·g ⁻¹	117
AP, APEO	Fangos	LiChrosorb-NH ₂ 250 x 4 mm LiChrosorb-RP8 250 x 3 mm	UV (278 nm)		118 119

- ¹¹⁵ Otsuki A., Shiraiishi H., *Determination of poly(oxyethylene) alkylphenyl ether nonionic surfactants in water at trace levels by reversed phase adsorption liquid chromatography and field desorption mass spectrometry*. Anal. Chem. 51; 2329-2332, 1979.
- ¹¹⁶ Rothman A.M., *High-performance liquid chromatographic method for determining ethoxymer distribution of alkylphenoxy polyoxyethylene surfactants*. J. Chrom. A 253; 283-288, 1982.
- ¹¹⁷ Kudoh M., Ozawa H., Fudaro S., Tsuji K., *Determination of trace amounts of alcohol and alkylphenol ethoxylates by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection*. J. Chrom. A 287; 337-344, 1984.
- ¹¹⁸ Giger W., Brunner P.H., Schaffner C., *4-Nonylphenol in sewage sludge: accumulation of toxic metabolites from nonionic surfactant*. Science 225; 623-625, 1984.
- ¹¹⁹ Giger W., Ahel M., Schaffner C., *In Analysis of Organic Micropollutants in Water*; Angeletti, G., Bjoerseth, A., Eds.; D. Reidel Publ.: Dordrecht, The Netherlands, 1984; p 91.

Tabla 1.6. Análisis de APEO mediante cromatografía líquida. (cont.)

Analitos	Matriz	Columna	Detección	Límite de Detección	Ref
NP, NPEO	Aguas residuales Agua de río Fangos	LiChrosorb-NH ₂ 250 x 4.6 mm Hypersil AP 60 x 4 mm LiChrosorb-RP8 250 x 3 mm	UV (277 nm)	0.5 µg·L ⁻¹	120,121 122,123
AP, APEO	Mezcla comercial	Nucleosil C ₁₈ 250 x 4 mm	Refractometría diferencial	2 µg·L ⁻¹	124
NP, NPEO	Aguas residuales	LiChrosorb-NH ₂ 250 x 4.6 mm	UV (277 nm)	1.0-3.0 µg·L ⁻¹	125
NPECs APEO APECs	Aguas de depuradoras Agua de río Agua potable	LiChrosorb-NH ₂ 250 x 4.6 mm LC (Brownlee Labs) 250 x 4.6 mm	UV (277 nm) PB-MS en modo EI	1.0 µg·L ⁻¹	126 127

¹²⁰ Ahel M., Giger W., Molnar-Kubica E., Schaffner C., *In Analysis of Organic Micropollutants in water*, Angeletti G., Bjoerseth A., D. Reidel Publ.: Dordrecht, The Netherlands, p 280, 1984.

¹²¹ Diercxsens P., Tarradellas J., *Soil contamination by some organic micro pollutants related to sewage sludge spreading*. Int. J. Environ. Anal. Chem. 28; 143-159, 1987.

¹²² Ahel M., *Infiltration of Organic Pollutants into Ground Water: Field Studies in the Alluvial Aquifer of the Sava River*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 47; 586-593, 1991.

¹²³ Ahel M., Giger W., Schaffner C., *Behaviour of Alkylphenol Polyethoxylate surfactants in the aquatic environment II. Occurrence and transformation in rivers*. Water Res. 28; 1143-1152, 1994.

¹²⁴ König H., Ryschka R., Strobel W., *Trennung, identifizierung und bestimmung nichtionischer tenside mittels Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie*. Fresenius' Z. Anal. Chem. 321; 263-267, 1985.

¹²⁵ Ahel M., Giger W., *Determination of nonionic surfactants of the Alkylphenol Polyethoxylate type by High-Performance Liquid Chromatography*. Anal. Chem. 57; 2584-2590, 1985.

¹²⁶ Ahel M., Conrad T., Giger W., *Persistent organic chemicals in sewage effluents. 3. Determinations of Nonylphenoxy Carboxylic Acids by High-Resolution Gas Chromatography/Mass Spectrometry and High-Performance Liquid Chromatography*. Environ Sci. Technol. 21; 697-703, 1987.

¹²⁷ Clark L.B., Rosen R.T., Hartman T.G., Louis J.B., Suffet I.H., Lippincott R.L., Rosen J.D., *Determination of Alkylphenol Ethoxylates and their acetic acid derivatives in drinking water by particle beam Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*. Int. J. Environ. Anal. Chem. 47; 167-180, 1992.

Tabla 1.6. Análisis de APEO mediante cromatografía líquida. (cont.)

Analitos	Matriz	Columna	Detección	Límite de Detección	Ref
OPEOs	Mezcla comercial	CSC-C ₁ 150 x 4.6 mm	UV (225 nm)		128
NP, NPEO LAS	Detergentes Limpiadores de superficies duras	LiChrosorb-RP8 100 x 4 mm	UV (225 nm)	95 ng NP	129
	Fangos Suelos Sedimentos río	Octadecilsilica ODS II 250 x 4 mm	FD (230/295 nm)	65 ng NPEO	130
NP, NPEO	Suelos enmendados con fangos	Aminosilica	FD (225/304 nm)		131
NP, NPEO LAS	Agua de mar Sedimentos	Hypersil AP 100 x 4 mm	UV (277 nm)		132,133
		Spherisorb SE ODS II 250 x 4 mm	FD (225/304 nm)		
		LiChrosorb-RP8 100 x 4 mm	FD (225/304 nm)		

¹²⁸ Brown D., DeHenau H., Garrigan J.T., Gerike P., Holt M., Kunkel E., Matthijs E., Keck E., Waters J., Watkinson R.J., *Removal of nonionics in sewage treatment plants. II. Removal of domestic detergent nonionic surfactants in a trickling filter sewage treatment plant.* Tenside Surf. Det; 24; 14-18, 1987.

¹²⁹ Marcomini A., Giger W., *Simultaneous determination of Linear Alkylbenzene Sulfonates, Alkylphenol Polyethoxylates, and Nonylphenol by high-performance liquid chromatography.* Anal. Chem. 59; 1709-1715, 1987.

¹³⁰ Marcomini A., Filipuzzi F., Giger W., *Aromatic surfactants in laundry detergents and hard-surface cleaners: Linear alkylbenzenesulphonates and alkylphenol polyethoxylates* Chemosphere 17; 853-863, 1988.

¹³¹ Marcomini A., Capel P.D., Giger W., Haeni H., *Residues of detergent-derived organic pollutants and polychlorinated biphenyls in sludge-amended soil.* Naturwissenschaften 75; 460-462, 1988.

¹³² Marcomini A., Stelluto S., Pavoni B., *Determination of Linear Alkylbenzenesulphonates and Alkylphenol Polyethoxylates in commercial products and marine waters by Reversed- and Normal Phase HPLC.* Int. J. Environ. Anal. Chem. 35; 207-218, 1989.

¹³³ Marcomini A., Pavoni B., Sfriso A., Orio A.A., *Persistent metabolites of Alkylphenol Polyethoxylates in the marine environment.* Mar. Chem. 29; 307-323, 1990.

Tabla 1.6. Análisis de APEO mediante cromatografía líquida. (cont.)

Analitos	Matriz	Columna	Detección	Límite de Detección	Ref
NPEO	Mezcla comercial	LiChrosorb-Diol 250 x 4.6 mm	UV (275 nm)	51-132 ng	134
		Amino SIL-X-100 250 x 4.6 mm			
NPEO	Agua de río Agua residual tratada	HS-5 C18 150 x 4.6 mm	FD (229/310 nm)	0.1 µg·L ⁻¹	135
		Microsorb CN 250 x 4.6 mm			
APECs	Mezclas técnicas	LiChrosphere 100 RP-18 125 x 4 mm	UV (276 nm)	100 µg·L ⁻¹	136
NP NPEO LAS SPCs	Aguas de depuradoras Fangos	LiChrosphere RP-18 125 x 4 mm	FD (225/295 nm)		137
NPEO NPECs LAS SPCs	Aguas de depuradoras Fangos	LiChrosphere RP-18 125 x 4 mm LiChrosorb RP-18 100 x 4 mm	FD (225/295 nm)	NPEO NPECs LAS SPCs	138

¹³⁴ Zhou C., Bah A., Schwedt G., *Separation and determination of non-ionic surfactants of the Nonylphenol Polyglycol Ether type by Liquid Chromatography*. Anal. Chim. Acta 236; 273-280, 1990.

¹³⁵ Kubeck E., Naylor C.G., *Trace analysis of alkylphenol ethoxylates*. J. Am. Oil Chem. Soc. 67; 400-405, 1990.

¹³⁶ König H., Strobel W., *Separation, identification and determination of alkyl- and alkylphenol ether carboxylates by HPLC*. Fresenius Z. Anal. Chem. 338; 728-735, 1990.

¹³⁷ Marcomini A., Di Corcia A., Samperi R., Capri S., *Reverse-phase HPLC determination of Linear Alkylbenzene sulphonates, Nonylphenol Polyethoxylates and their biotransformation products*. J. Chrom. 644; 59-71, 1993.

¹³⁸ Marcomini A., Tortato C., Capri S., Liberatori A., *Preparation, characterization and RP-HPLC determination of sulphophenyl and nonylphenoxy carboxylates*. Ann. Chim. 83; 461-484, 1993.

Tabla 1.6. Análisis de APEO mediante cromatografía líquida. (cont.)

Analitos	Matriz	Columna	Detección	Límite de Detección	Ref
NP	Fangos	Hypersil AP 100 x 4.6 mm	UV (277 nm)		139
NP NPEO NPECs	Aguas de depuradoras	Supelco C ₈ 250 x 4.6 mm	FD (225/295 nm)	0.2 µg·L ⁻¹ NP 0.6 µg·L ⁻¹ NPEO	140
NPEO	Agua Fangos	Supercosil -NH ₂ 250 x 4.6 mm	UV (220 nm)	1.57 µg·L ⁻¹	141
NPEO	Agua de río Sedimentos	Hypersil AP 100 x 2.1 mm	FD (230/300 nm)	0.02 µg·L ⁻¹ 0.015 µg·g ⁻¹	142
NP	Matrices biológicas	Hypersil AP 125x 4mm	FD (260/300 nm)		143

7.2.4 - Cromatografía de gases.

La cromatografía de gases es inherentemente una técnica separativa más potente que la cromatografía líquida, pero está limitada por la volatilidad de los compuestos a analizar. Solamente pueden determinarse mediante cromatografía de gases con detección directa los APEO que poseen un

¹³⁹ Sweetman A, *Development and application of multi-residue analytical method for the determination of n-alkanes, linear alkylbenzenes, polynuclear aromatic hydrocarbons and 4-nonylphenols in digested sewage sludges*. J. Water Res. 28; 343-353, 1994.

¹⁴⁰ Di Corcia A., Saperi R., Marcomini A., *Monitoring aromatic surfactants and their biodegradation intermediates in raw and treated sewages by Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography*. Environ. Sci. Technol. 28; 850-858, 1994.

¹⁴¹ Boyd-Boland, A.A., Pawliszyn, J.B., *Solid-Phase Microextraction Coupled with High-Performance Liquid Chromatography for the determination of Alkylphenol Ethoxylate surfactants in water*. Anal. Chem. 68; 1521-1529, 1996.

¹⁴² Bennie, D.T., Sullivan, C.A., Lee, H.B., Peart, T.E., Maguire, R., *Occurrence of Alkylphenols and Alkylphenol mono- and diethoxylates in natural waters of the Laurentian Great Lakes basin and the upper St. Lawrence River*. J. Sci. Total Environ. 193; 263-275, 1997.

¹⁴³ Günther K., Durbeck H.W., Prast H., Kleist E., Thiele B., Schwuger M.J., *Endocrine-disrupting nonylphenols - ultra-trace analysis and time-dependent trend in mussels from the German bigh*. Fresenius J. Anal. Chem. 371; 782-786, 2001.

número bajo de unidades etoxiladas. Por tanto, si el número de unidades etoxiladas es alto, se requiere transformar los APEO en compuestos más volátiles. Cuando se acopla a la espectrometría de masas aumenta su potencialidad para determinar tanto APEO como AP en matrices medioambientales debido a sus cualidades de alta sensibilidad y selectividad. En la **Tabla 1.7** se recogen algunas aplicaciones de la cromatografía de gases para el análisis medioambiental de APEO y sus metabolitos.

Tabla 1.7. Análisis de APEO mediante cromatografía de gases.

Analitos	Matriz	Derivatización	Detección	Límite de Detección	Ref
NP	Matrices biológicas		EI-MS		111
NP	Fangos		FID		114,115
NP, NPEO	Aguas residuales Agua de río Sedimentos	PFBCI	FID EI-MS		144
NP, NPEO	Aguas de depuradora		EI-MS	Semicuantitativo	145,146
NP, NPEO	Aguas de depuradora		EI-MS	10 µg·L ⁻¹	147

¹⁴⁴ Jungclaus, G.A., López-Avila, V., Hites, R.A., *Organic compounds in an industrial wastewater: A case study of their environmental impact*. Environ. Sci. Technol. 12; 88-96, 1978.

¹⁴⁵ Giger W., Stephanou E., Schaffner C., *Persistent organic chemicals in sewage effluents: 1. Identifications of nonylphenols and nonylphenolethoxylates by glass capillary gas chromatography / mass spectrometry*. Chemosphere 10; 1253-1263, 1981.

¹⁴⁶ Giger W., Schaffner C., Stephanou E., *In Analysis of Organic Micropollutants in Water*; Bjoerseth, A., Angeletti, G., Eds.; D. Reidel Publ.: Dordrecht, The Netherlands, p 330, 1982.

¹⁴⁷ Stephanou E., Giger W., *Persistent organic chemicals in sewage effluents. 2. Quantitative determinations of Nonylphenols and Nonylphenol Ethoxylates by glass capillary Gas Chromatography*. Environ. Sci. Technol., 16; 800-805, 1982.

Tabla 1.7. Análisis de APEO mediante cromatografía de gases. (cont.)

Analitos	Matriz	Derivatización	Detección	Límite de Detección	Ref
APECs, BrAPEC	Aguas de depuradora	Diazometano	EI-MS		148
OPEOs OPECs	Mezclas técnicas		EI-MS CI-MS	1.0 µg·L ⁻¹	149,150
APEO	Aguas de depuradora		FID CI-MS		151
NP, NPEO	Aguas de depuradora Aguas superficiales		CI-MS	NP, NPEO	152
APEO APECs	Mezclas técnicas	BSTFA	EI-MS		153
APEO	Agua de río		EI-MS		154
NP	Suelos		FID EI-MS	0.05-0.1 mg·kg ⁻¹	155

- ¹⁴⁸ Reinhard M., Goodman N., Mortelmans K.E., *Occurrence of Brominated Alkylphenol Polyethoxy Carboxylates in mutagenic wastewater concentrates*. Environ. Sci. Technol. 16; 351-362, 1982.
- ¹⁴⁹ Stephanou E., *Chemical ionization mass spectra of Alkylphenol and Linear Alcohol Polyethoxylates*. Org. Mass Spectrom. 19; 510-513, 1984.
- ¹⁵⁰ Stephanou E., Reinhard M., Ball H.A., *Identification and quantification of halogenated and non-halogenated Octylphenol Polyethoxylate residues by Gas Chromatography/Mass Spectrometry using Electron ionization and Chemical Ionization*. Biomed. Environ. Mass Spectrom. 15; 275-282, 1988.
- ¹⁵¹ Shiraishi H., Otsuki A., Fuwa K., *Identification of extractable organic chemicals in sewage effluent by gas chromatography/mass spectrometry*. Biomed. Mass Spectrom. 12; 86-94, 1985.
- ¹⁵² Stephanou E., *Environmental determination of alkylphenol polyethoxylate refractory residues using mass spectrometric techniques*. Int. J. Environ. Anal. Chem. 20; 41-50, 1985.
- ¹⁵³ Bjoerseth A., Angeletti G., *In Organic Micropollutants in the Aquatic Environment*, Eds.; D. Reidel Publ.: Dordrecht, The Netherlands, p 155, 1986.
- ¹⁵⁴ Rivera J., Ventura F., Caixach J., De Torres M., Figueras A., Guardiola J., *GC/MS, HPLC and FAB mass spectrometry analysis of organic micropollutants in Barcelona water supply*. Int. J. Environ. Anal. Chem. 29; 15-35, 1987.
- ¹⁵⁵ Jobst H., *Bestimmung von isomeren 4-Nonylphenolen in Boden*. Fresenius' Z. Anal. Chem. 328; 644-647, 1987.

Tabla 1.7. Análisis de APEO mediante cromatografía de gases. (cont.)

Analitos	Matriz	Derivatización	Detección	Límite de Detección	Ref
NP, NPEO NPECs	Aguas de depuradora Agua de río	BF ₃ o HCl/MeOH	FID EI-MS	1.0 µg·L ⁻¹	156
NP, NPEO	Agua de río		EI-MS		157
APEO	Tensioacti- vos técnicos	py/HMDS/ TMCS	FID		158
NPEO	Aguas residuales Agua de mar Sedimentos	Diazometano ó BSTFA	FID CI-MS EI-MS		159
NP, NPEO	Aguas residuales Aguas de depuradora Biota		ECD EI-MS CI-MS	0.1-1 µg·L ⁻¹ 0.1-2 mg·kg ⁻¹ (Fangos) 1-6 µg·kg ⁻¹ (Biota)	160
NP	NP técnico	Diazometano ó BSTFA	FID EI-MS		161

- ¹⁵⁶ Ahel M., Conrad T., Giger W., *Persistent Organic Chemicals in Sewage Effluents. 3. Determinations of Nonylphenoxy Carboxylic Acids by High-Resolution Gas Chromatography/Mass Spectrometry and High-Performance Liquid Chromatography*. Environ. Sci. Technol. 21; 697-703, 1987.
- ¹⁵⁷ Ventura F., Figueras A., Caixach J., Espadaler I., Romero J., Guardiola J., Rivera J., *Characterization of Polyethoxylated Surfactants and Their Brominated Derivatives Formed at the Water Treatment Plant of Barcelona by GC/MS and FAB Mass Spectrometry*. Water Res. 22; 1211-1217, 1988.
- ¹⁵⁸ Sandra P., David F.J., *Microcolumn chromatography for the analysis of detergents and lubricants. I, High temperature capillary gas chromatography (HT-CGC) and capillary supercritical fluid chromatography (CSFC)*. High Res. Chromatogr. 13; 414-417, 1990.
- ¹⁵⁹ Valls M., Bayona J.M., Albaiges J., *Broad spectrum analysis of ionic and non-ionic organic contaminants in urban wastewaters and coastal receiving aquatic systems*. J. Environ. Anal. Chem 39; 329-333, 1990.
- ¹⁶⁰ Wahlberg C., Renberg L., Wideqvist U., *Determination of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates as their pentafluorobenzoates in water, sewage sludge and biota*. Chemosphere 20; 179-195, 1990.
- ¹⁶¹ Bhatt B.D., Prasad J.V., Kalpana G., Ali S., *Separation and characterization of isomers of para-nonylphenols by capillary GC/GC-MS/GC-FTIR techniques*. J. Crom. Sci. 30; 203-210, 1992.

Tabla 1.7. Análisis de APEO mediante cromatografía de gases. (cont.)

Analitos	Matriz	Derivatización	Detección	Límite de Detección	Ref
NP	Agua de riego Agua potable		MS		162
NP	Agua séptica lixiviada		MS	1.0 µg·L ⁻¹	163
NP	Fangos Sedimentos	PFBBBr	ECD EI-MS CI-MS	2.9 pg·g ⁻¹ 1.4 pg·g ⁻¹ 0.3 pg·g ⁻¹	164
NP	Agua de río Agua de mar		EI-MS	0.03-0.2 µg·L ⁻¹	165
NP	Fangos	PFBCl	FID EI-MS	0.5 mg·kg ⁻¹	166
NP	Aguas y fangos de depuradoras	Anhidrido acético	EI-MS	0.1 µg·L ⁻¹ 0.1 mg·kg ⁻¹	167
NP	NP técnico		FID		168
NP	NP técnico		EI-MS FTIR		169

¹⁶² Petrick G., Schulz-Bull D.E., Duinker J.C., *Analyses for polychlorinated biphenyls and organic contaminants in drinking water*. Z. Wasser Abwasser Forsch. 25; 115-121, 1992.

¹⁶³ Oeman C., Hynning P.A., *Identification of organic compounds in municipal landfill leachates*. Environ. Pollut. 80; 265-271, 1993.

¹⁶⁴ Chalaux N., Bayona J.M., Albaiges J., *Determination of Nonylphenols as pentafluorobenzyl derivatives by Capillary Gas Chromatography with Electron-Capture and Mass Spectrometric detection in environmental Matrices*. J. Chrom. A 686, 275-281, 1994.

¹⁶⁵ Blackburn M.A., Waldock M.J., *Concentrations of alkylphenols in rivers and estuaries in England and Wales*. Water Res. 29; 1623-1629, 1995.

¹⁶⁶ Jobst, H., *Chlorophenols and Nonylphenols in sewage sludges. Part I: Occurrence in sewage sludges of western German treatment plants from 1987 to 1989*. Acta Hydrochim. Hydrobiol. 23; 20-25, 1995.

¹⁶⁷ Lee H.B., Peart T.E., *Determination of 4-Nonylphenol in effluent and sludge from sewage treatment plants*. Anal. Chem. 67; 1976-1980, 1995.

¹⁶⁸ Chee K.K., Wong M.K., Lee H.K., *Determination of 4-nonylphenol -part 1: Optimization of the gas chromatographic determination of 4-nonylphenol by orthogonal array design and electronic pressure programming*. J. Microcolumn Sep. 8; 29-36, 1996.

¹⁶⁹ Wheeler T.F., Heim J.R., La Torre M.R., Janes A.B., *Mass spectral characterization of p-nonylphenol isomers using high-resolution capillary GC-MS*. J. Crom. Sci. 35; 19-30, 1997.

7.2.5 - Cromatografía de Fluidos Supercríticos

En la cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) se usan fluidos por encima de su temperatura y presión críticas. Bajo estas condiciones los fluidos supercríticos tienen densidades típicas de los líquidos mientras que mantienen coeficientes de difusión típicos de los gases. Frecuentemente trabajando con SFC se obtienen mejores resoluciones y menores tiempos de análisis que con LC. Además esta técnica no requiere que los compuestos sean volátiles como ocurre con la GC. Por otra parte, la detección con SFC puede llevarse a cabo mediante FID, que tiene una respuesta lineal en un amplio rango de concentraciones y es más fácil de manejar que los detectores convencionales usados en LC.

En las publicaciones consultadas sólo se han encontrado aplicaciones de esta técnica a mezclas comerciales de tensioactivos^{170,171}.

7.2.6 - Electroforesis Capilar

Mediante electroforesis capilar (CE) se pueden analizar sustancias cargadas o neutras con un alto grado de resolución. Esto es posible gracias a la forma plana del perfil del frente de fase móvil, que como resultado, contribuye a que el ensanchamiento de banda del analito sea mucho menor.

¹⁷⁰ Wang Z., Fingas M., *Analysis of polyethoxylated nonylphenols by Supercritical Fluid Chromatography and High-Performance Liquid Chromatography*. J. Chrom. Sci. 31; 509-518, 1993.

¹⁷¹ Wang Z., Fingas M., *Quantitative Analysis of Polethoxylated Octylphenol by Capillary Supercritical Fluid Chromatography* J. Chrom. 641; 125-136, 1993.

Esta técnica puede ser acoplada a detectores comúnmente utilizados en otras técnicas separativas: espectrometría de masas, de fluorescencia, UV-Visible, y otros. En bibliografía se han encontrado pocos trabajos que utilicen esta técnica para la determinación de APEO^{172,173}. A pesar de los resultados, la aplicabilidad de la CE a la determinación de surfactantes no iónicos está limitada debido a la insuficiente resolución de picos y su baja sensibilidad.

7.3 Alcoholes etoxilados

Debido a la enorme complejidad que presentan las mezclas comerciales de alcoholes etoxilados y la ausencia de patrones individuales, la metodología analítica más ampliamente usada para la determinación de los mismos ha sido la cromatografía líquida con detección de masas (LC-MS). A continuación se resume la metodología encontrada en bibliografía para la determinación de estos analitos.

7.3.1 - Espectrometría de absorción molecular UV-vis (colorimetría)

En el apartado 7.2.1 del presente capítulo se han comentado los principales métodos colorimétricos empleados para la determinación de tensioactivos no iónicos. Como se ha indicado anteriormente, estos

¹⁷² Heinig K., Vogt C., Werner G., *Separation of ionic and neutral surfactants by Capillary Electrophoresis and High-Performance Liquid Chromatography*. J. Chrom. A 745; 281-292, 1996.

¹⁷³ Heinig K., Vogt C., Werner G., *Separation of nonionic surfactants of the polyoxyethylene Type by Capillary Electrophoresis*. Fresenius J. Anal. Chem. 357; 695-700, 1997.

métodos son no específicos y tienen la limitación de ser sensibles sólo a tensioactivos con un número de unidades etoxiladas inferior a 6.

7.3.2 - Espectrometría IR y RMN

En el apartado 7.2.2 se muestran algunas referencias bibliográficas para la identificación de tensioactivos no iónicos en distintas matrices. Mediante IR y RMN es posible distinguir entre AEO y APEO.

7.3.3 - Cromatografía de líquidos

La cromatografía de líquidos se ha usado para analizar mezclas complejas de AEO en muy diversas matrices. Generalmente ha sido empleada en fase normal para proporcionar información acerca de la distribución de etoxímeros. En fase reversa generalmente ha sido usada para separar AEO en función de la longitud de su cadena.

La ausencia de grupos cromóforos en la molécula de AEO hace necesaria una etapa de derivatización previa a su determinación mediante LC con detección convencional. Algunos de los agentes derivantizantes empleados con este fin han sido: cloruro de 3,5-dinitrobenzoilo^{174,175}, isocianato de fenilo¹⁷⁶ e isocianato de naftilo^{177,178}.

¹⁷⁴ Nozawa A., Ohnuma T., *Improved high-performance liquid chromatographic analysis of ethylene oxide condensates by their esterification with 3,5-dinitrobenzoyl chloride*. J. Chrom. A 187; 261-263, 1980.

¹⁷⁵ Desbène P.L., Desmazières B., Even V., Basselier J.J., Minissieux L., *Analysis of non-ionic surfactants used in tertiary oil recovery. Optimisation of stationary phase in normal phase partition chromatography*. Chromatographia 25; 857-861, 1987.

La combinación de LC con un detector de dispersión de luz “light scattering”^{179,180} permite el análisis de AEO sin una etapa previa de derivatización. Sin embargo, su limitación está en la falta de sensibilidad requerida para llevar a cabo el análisis medioambiental.

Para proveer información acerca de la distribución de homólogos, oligómeros e isómeros, la metodología actual se ha focalizado en el uso de la cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas como detector (LC-MS). El uso de LC-MS utilizando termospray¹⁸¹ e ionización con electrospray (ESI)^{182,183} ha permitido obtener esta información. Sin embargo, estos métodos tienen el inconveniente de que la ionización de cada compuesto etoxilado varía enormemente no pudiendo ser detectados frecuentemente los alcoholes etoxilados con menos de 3 unidades etoxiladas. Los métodos LC-MS que usan ionización química a presión atmosférica (APCI) se han empleado

¹⁷⁶ Allen M.C., Linder D.E., *Ethylene oxide oligomer distribution in nonionic surfactants via high performance liquid chromatography (HPLC)*. J. Am. Oil Chem. Soc. 58; 950-957, 1981.

¹⁷⁷ Lemr K., Zanette M., Marcomini A., *Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatographic separation of 1-naphthyl isocyanate derivatives of linear alcohol polyethoxylates*. J. Chrom. A 686; 219-224, 1994.

¹⁷⁸ Marcomini A., Zanette M., *Chromatographic determination of non-ionic aliphatic surfactants of the Alcohol Polyethoxylate type in the environment*. J. Chrom. A 733; 193-206, 1996.

¹⁷⁹ Dubey S.T., Kravetz L., Salanitro J.P., *Analysis of nonionic surfactants in bench-scale biotreater samples*. J. Am. Oil Chem. Soc. 72; 23-30, 1995.

¹⁸⁰ Cretier G., Podevin C., Rocca J.L., *Analysis of aliphatic alcohol ethoxylates in terms of alkyl and ethylene oxide chain lengths by Reversed-Phase Liquid Chromatography with Evaporative Light Scattering detection*. J. Chrom. A 874; 305-310, 2000.

¹⁸¹ Evans K.A., Dubey S.t., Dravetz L., Dzidic I., Gumulka J., Mueller R., Stork J.R., *Quantitative determination of Linear Primary Alcohol Ethoxylate surfactants in environmental samples by Thermospray LC/MS*. Anal. Chem. 66; 699-705, 1994.

¹⁸² Crescenzi, C., Di Corcia A., Saperi R., Marcomini A., *Determination of Nonionic Polyethoxylate surfactants in environmental waters by Liquid Chromatography/Electrospray Mass Spectrometry*. Anal. Chem. 67; 1797-1804, 1995.

¹⁸³ Evans K.A., Dubey S.T., Kravetz L., Evetts S.W., Dzidic I., Dooyema C.C., *Quantitation of alcohol ethoxylate surfactants in environmental samples by electrospray mass spectrometry*. J. Am. Oil Chem. Soc. 74; 765-773, 1997.

satisfactoriamente para el análisis de AEO en muestras ambientales^{184,185,186}. Sin embargo, la APCI ha mostrado tener menor sensibilidad con los AEO con menor número de unidades etoxiladas pudiéndose producir además degradación térmica de aquellos con mayor grado de etoxilación¹⁸⁷. Se han desarrollado métodos que emplean estrategias de derivatización convirtiendo los AEO en soluciones iónicas o ionizables con el objetivo de ayudar al proceso LC-MS¹⁸⁸. Así, Dunphy y col.¹⁸⁹ utilizan una reacción del grupo hidroxilo terminal con 2-fluoro-N-methylpridinium p-toluenesulphonate, confiriendo una carga positiva, permitiendo la determinación de todas las especies, incluyendo los alcoholes libres, mediante ESI-MS. Sparham y col.¹⁹⁰ utiliza como agente derivatizante el anhídrido ftálico, empleado ampliamente como cromóforo en LC¹⁹¹. En este caso el agente derivatizante facilita la

¹⁸⁴ Castillo M., Alonso M.C., Riu J., Barceló D., *Identification of polar, ionic, and highly water soluble organic pollutants in untreated industrial wastewaters*. Environ. Sci. Technol. 33; 1300-1306, 1999.

¹⁸⁵ Castillo M., Barceló D., *Identification of polar toxicants in industrial wastewaters using toxicity-based fractionation with Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*. Anal. Chem. 71; 3769-3776, 1999.

¹⁸⁶ Krogh K.A., Vejrup K.V., Mogensen B.B., Halling-Sorensen B., *Liquid Chromatography–Mass Spectrometry method to determine alcohol ethoxylates and alkylamine ethoxylates in soil interstitial water, ground water and surface water samples*. J. Chrom. A 957; 45-57, 2002.

¹⁸⁷ Cassani G., Pratesi C., Faccetti L., Pravettoni S., Nucci G., Andriollo N., Valtorta L., Matheson L., *Characterization of alcohol ethoxylates as alcohol ethoxy sulfate derivatives by liquid chromatography-Mass spectrometry*. J. Surf. Det. 7; 195-202, 2004.

¹⁸⁸ Quirke J.M.E., Adam C.L., VanBerkel G.J., *Chemical Derivatization for Electrospray Ionization Mass Spectrometry. Alkyl Halides, Alcohols, Phenols, Thiols, and Amines*. Anal. Chem. 66; 1302-1315, 1994.

¹⁸⁹ Dunphy J.C., Pessler D.G., Morrall S.W., *Derivatization LC/MS for the simultaneous determination of Fatty Alcohol and Alcohol Ethoxylate Surfactants in water and wastewater samples*, Environ. Sci. Technol. 35; 1223- 1230, 2001.

¹⁹⁰ Goss J., *Reverse phase high-performance liquid chromatographic determination of primary and secondary aliphatic alcohols as phthalate monoesters by UV detection* Chromatographia 38; 417-420, 1994.

¹⁹¹ Sparham C.J., Bromilow I.D., Dean J.R., *SPE/LC/MS with phthalic anhydride derivatisation for the determination of alcohol ethoxylate surfactants in sewage influent and effluent samples*. J. Chrom. A, 1062; 39-47, 2005.

detección de todos los compuestos etoxilados mediante ESI-MS en modo de ionización negativo.

7.3.4 - Cromatografía de gases

La aplicación de la cromatografía de gases al análisis de AEO ha estado limitada a compuestos con menos de 5 unidades etoxiladas, debido a la alta polaridad, baja volatilidad e inestabilidad térmica asociada con los oligómeros más pesados¹⁹². Sin embargo, se ha llevado a cabo el estudio de biodegradación de AEO mediante GC detectando mediante ionización de llama (FID) los alquilbromuros generados con ácido bromhídrico (HBr) como agente derivatizante¹⁹³.

Mediante la cromatografía de gases de alta temperatura (HT-GC) se pueden separar AEO en función tanto del número de unidades etoxiladas como el número de carbonos de la cadena alquílica. Corinna y col.¹⁹⁴ aplicaron la HT-GC acoplada a un detector de emisión atómica (EAD) para evaluar la distribución de alcoholes etoxiladas en mezclas comerciales como el Brij 30, con una media de unidades etoxiladas no superior a 4, debido a la baja volatilidad de los compuestos con mayor número de unidades etoxiladas.

¹⁹² Chiron S., Sauvard E., Jeannot R., *Determination of nonionic polyethoxylate surfactants in wastewater and sludge samples of sewage treatment plants by liquid chromatography-mass spectrometry*. *Analisis* 28; 535-542, 2000.

¹⁹³ Tobin R.S., Onuska F.I., Brownlee B.G., Anthony D.H.J., Comba M.E., *The application of an ether cleavage technique to a study of the biodegradation of a linear alcohol ethoxylate nonionic surfactant*. *Water Res.* 10; 529-535, 1976.

¹⁹⁴ Asmussen C., Stan H-J., *Determination of non-ionic surfactants of the Alcohol Polyethoxylate type by means of High Temperature Gas Chromatography and Atomic Emission Detection*. *J. High Resol. Chrom.* 21; 597-604; 1998.

7.3.5 - Cromatografía de fluidos supercríticos

La cromatografía de fluidos supercríticos ha sido usada con éxito para el análisis de AEO. Es frecuente el empleo de reacciones de derivatización con el objetivo de mejorar la solubilidad de los analitos en la fase móvil^{195,196}.

Debido a la mayor difusividad y menor viscosidad del CO₂ comparado con las fases móviles tradicionales de LC, en SFC puede operarse a mayores flujos y/o usar columnas empaquetadas de mayor longitud que en LC¹⁹⁷.

En los últimos años, la adición de modificadores orgánicos como acetonitrilo y metanol al CO₂ supercrítico, ha permitido trabajar a bajas temperaturas y relativamente bajas presiones, permitiendo mejorar en algunos casos la morfología de los picos cromatográficos^{198,199}.

¹⁹⁵ Berger T.A., Todd B.S., *Packed column Supercritical Fluid Chromatography of oligoethers using pure carbon dioxide with Flame Ionization and Ultraviolet Detection*. *Chromatographia* 54; 777-781, 2001.

¹⁹⁶ Hoffman B.J., Taylor L.T., Rumbelow S., Goff L., Pinkston J.D., *Separation of derivatized alcohol ethoxylates and propoxylates by low temperature packed column supercritical fluid chromatography using ultraviolet absorbance detection*. *J. Chrom. A* 1034; 207-212, 2004.

¹⁹⁷ Berger T.A.; R.M. Smith (Ed.) *Packed Column SFC*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1-21, 1995.

¹⁹⁸ Brossard S., Lafosse M., Dreux M., *Comparison of Ethoxylated Alcohols and Polyethylene Glycols by High-Performance Liquid Chromatography and Supercritical Fluid Chromatography using Evaporative Light-Scattering detection*. *J. Chrom. A* 591; 149-157, 1992.

¹⁹⁹ Hoffman B.J., Taylor L.T., Rumbelow S., Goff L., Pinkston D., *Determination of alcohol polyether average molar oligomer value/distribution via supercritical fluid chromatography coupled with UV and MS detection*. *J. Chrom. A* 1043; 285-290, 2004.

7.3.6 - Electroforesis capilar

La utilización de la electroforesis capilar para llevar a cabo el análisis de AEO podría parecer dificultosa debido a la ausencia de grupos iónicos o ionizables en estos tensioactivos. Sin embargo, Heinig y col.²⁰⁰ consiguieron llevar a cabo la separación de los homólogos AEO en función de su grado de hidrofobicidad, mediante el uso de electrolitos conteniendo altas concentraciones de dodecil sulfato sódico (SDS) y porcentajes altos de acetonitrilo para prevenir la formación de micelas.

Bullock²⁰¹, Wallingfor²⁰², Heinig y col.²⁰³ y más recientemente Oudhoff²⁰⁴ emplean la derivatización con anhídrido ftálico con una doble finalidad: conferir carga a los AEO para posibilitar su separación mediante CE e introducir un grupo cromóforo que permita su detección mediante UV. Okada^{205,206} utilizó la habilidad de los AEO para formar compuestos cargados positivamente con algunos metales alcalinos y alcalinotérreos en medios no acuosos. Sin embargo, la resolución para homólogos con más de 16 unidades etoxiladas no es satisfactoria usando

²⁰⁰ Heinig K., Vogt C., Werner G., *Separation of ionic and neutral surfactants by Capillary Electrophoresis and High-Performance Liquid Chromatography* J. Chrom. A 745; 281-292, 1996.

²⁰¹ Bullock J., *Application of Capillary Electrophoresis to the analysis of the oligomeric distribution of polydisperse polymers*. J. Chrom. A 645; 169-177, 1993.

²⁰² Wallingford R.A., *Oligomeric separation of ionic and nonionic Ethoxylated Polymers by Capillary Gel Electrophoresis*. Anal. Chem. 68; 2541-2548, 1996.

²⁰³ Heinig K., Vogt C., Werner G., *Separation of Nonionic Surfactants by Capillary Electrophoresis and High-Performance Liquid Chromatography*. Anal. Chem. 70; 1885-1892, 1998.

²⁰⁴ Oudhoff K.A., Schoenmakers P.J., Kok W.Th., *Characterization of polyethylene glycols and polypropylene glycols by capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic chromatography*. J. Chrom. A 985; 479-491, 2003.

²⁰⁵ Okada T., *Nonaqueous ion-exchange Chromatography and Electrophoresis Approaches to nonaqueous solution chemistry and design of novel separation*. J. Chrom. A 804; 17-28, 1998.

²⁰⁶ Okada T., *Non-aqueous Capillary Electrophoretic separation of Polyethers and evaluation of weak complex formation*. J. Chrom. A 695; 309-317, 1995.

capilares de sílice sin recubrir. Desbène y col.²⁰⁷ lograron solventar este problema cambiando el sentido del flujo electroosmótico (FEO) a través del recubrimiento del capilar de sílice con hexadimetrina que además permite mejorar la repetibilidad de los análisis.

²⁰⁷ Desbène A.M., Geulin L., Morin C.J., Desbène P.L., *Analysis of neutral surfactants by non-aqueous capillary electrophoresis using an electroosmotic flow reversal*. J. Chrom. A 1068; 159-167, 2005.

8.- TRATAMIENTO DE MUESTRAS

De las etapas que componen el proceso de análisis, una de las más críticas e importantes es, sin duda, el tratamiento de la muestra.

En el caso de **muestras sólidas**, el proceso suele comenzar con la trituración de la muestra para aumentar el área superficial de la misma, lo que facilita la extracción de los analitos, para pasar a continuación a la homogeneización y permitir así una toma de muestra representativa.

A continuación, los analitos son extraídos de la matriz con un disolvente adecuado, que será seleccionado en función de las características de los analitos, de la matriz y del proceso elegido para ello.

En la preparación de muestra pueden ser empleadas diversas técnicas, como extracción Soxhlet, extracción con ultrasonidos, con microondas (MAE), con líquidos presurizados (PLE), con fluidos supercríticos (SFE), por agitación, etc.

En la **Figura 1.19** se muestra un resumen del proceso. Como tendencias en la investigación actual se puede citar: reducción del volumen de extractante y del tiempo de extracción y aumento de la eficacia, para lo cual se están incorporando nuevas técnicas²⁰⁸.

Normalmente, una vez que los compuestos de interés se encuentran en disolución, es necesario realizar un proceso de limpieza (“clean-up”) para eliminar posibles interferencias. Para ello se pueden

²⁰⁸ Dean, J.R. *Methods for Environmental Trace Analysis*. John Wiley & Sons, ISBNs: 0-470-84421-3 (HB); 0-470-84422-1 (PB), Chichester, UK, 2003.

emplear técnicas, como la extracción líquido-líquido (LLE) o la extracción en fase sólida (SPE).



Figura 1.19 -Métodos de extracción de analitos en matrices sólidas

Finalmente, en ocasiones es necesario llevar a cabo una preconcentración y/o un cambio del disolvente para adecuar la disolución a introducir en el sistema de análisis a utilizar.

Existe numerosa bibliografía que describe los métodos de extracción de SPC, AP, APEO y AEO en distintas muestras medioambientales. En la **Tabla 1.9** se muestran algunos de los más representativos y a continuación se comentan las técnicas de extracción más empleadas.

Tabla 1.9. Métodos de extracción de SPC, AP, APEO y AEO en matrices medioambientales sólidas o semisólidas.

Analitos	Matriz	Extracción	Tiempo	Ref.
4-n-NP	Fangos	SFE		209
NP ₁₋₁₀ EO OP ₁₋₁₀ EO	Sedimentos	Soxhlet	16 h	210
NP ₁₋₂ EO 4-NP, 4-t-OP	Sedimentos	Soxhlet SFE	6 h 25 min.	211
OP, NP, NP ₁₋₂ EO		SFE Soxhlet		212-213
NP ₁₋₁₉ EO NP	Sedimentos marinos	Soxhlet Ultrasonidos	18 h 3 ciclos	214
NP, OP	Sedimentos	Ultrasonidos	15 min.	215
NP ₁₋₂ EO	Pescado	Soxhlet	4 h	
NP NP ₁₋₁₉ EO	Sedimentos	PLE		216

²⁰⁹ Lee H.B., Peart T.E., *Determination of 4-Nonylphenol in Effluent and Sludge from Sewage Treatment Plants*. Anal Chem. 67; 1976-1980, 1995.

²¹⁰ Voogt P., Beer K., van der Wielen F., *Determination of alkylphenol ethoxylates in industrial and environmental samples*. TrAc Trends in Analytical Chemistry 16; 584-595, 1997.

²¹¹ Bennie D.T., Sullivan C.A., Lee H.B., Peart T.E., Maguire R.J., *Occurrence of alkylphenols and alkylphenol mono- and diethoxylates in natural waters of the Laurentian Great Lakes basin and the upper St. Lawrence River*. Sci. Total Environ. 193; 263-275, 1997.

²¹² Bennett E.R., Metcalfe C.D., *Distribution of degradation products of Alkylphenol Ethoxylates near sewage treatment plants in the lower Great Lakes, North America*. Environ. Toxicol. Chem. 19; 784-792, 2000.

²¹³ Bennett E.R., Metcalfe C.D., *Distribution of alkylphenol compounds in great lakes sediments, United States and Canada*. Environ. Toxicol. Chem. 17; 1230-1235, 1998.

²¹⁴ Shang D.Y., Ikonomou M.G., Macdonald R.W., *Quantitative determination of nonylphenol polyethoxylate surfactants in marine sediment using normal-phase liquid chromatography-electrospray mass spectrometry*. J. Chrom. A 849; 467-482, 1999.

²¹⁵ Blackburn M.A., Kirby S.J., Waldock M.J., *Concentrations of alkylphenol polyethoxylates entering UK estuaries*. Mar. Pollut. Bull. 38; 109-118, 1999.

²¹⁶ Shang D.Y., Macdonald R.W., Ikonomou M.G., *Persistence of Nonylphenol Ethoxylate surfactants and their primary degradation products in sediments from near a municipal outfall in the Strait of Georgia, British Columbia, Canada*. Environ. Sci. Technol. 33; 1366-1372, 1999.

Tabla 1.9. Métodos de extracción de SPC, AP, APEO y AEO en matrices medioambientales sólidas o semisólidas. (cont.)

Analitos	Matriz	Extracción	Tiempo	Ref.
4-t-OP BPA	Pescado	MAE		217
LAS (C ₁₀ -C ₁₃) SPC (C ₄ -C ₁₃)	Sedimentos	Soxhlet	12 h	218
NP, OP, NPEO, NPECs, AEO (C ₁₀ -C ₁₈)	Fangos depuradora	Ultrasonidos	3x20 min	219
NP, OP, derivados halogenados y carboxilados NP ₁₋₃ EO, OP ₁₋₃ EO	Sedimentos	Ultrasonidos (flujo continuo de disolvente a elevada T ^a)	7 min	220
NP, NPEO NP ₁₋₂ EC	Fangos	Ultrasonidos		221
NP, 4-t-OP	Sedimentos	PLE o Soxhlet		222
4-NP, 4-NPEO	Sedimentos	PLE		223

- ²¹⁷ Pendersen S.N., Lindholm C., *Quantification of the xenoestrogens 4-tert-octylphenol and bisphenol A in water and in fish tissue based on microwave assisted extraction, solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry* J. Chrom. A 864; 17-24, 1999.
- ²¹⁸ León V.M., González-Mazo E., Gómez-Parra A., *Handling of marine and estuarine samples for the determination of Linear Alkylbenzene Sulfonates and Sulfophenylcarboxylic Acids*. J. Chrom. A 889; 211-219, 2000.
- ²¹⁹ Petrovic M., Barceló D., *Determination of anionic and non-ionic surfactants, their degradation products, and endocrine-disrupting compounds in sewage sludge by liquid chromatography/mass spectrometry*. Anal. Chem.; 72, 4560-4567, 2000.
- ²²⁰ Ferguson P.L., Iden C.R., Brownawell B.J., *Analysis of alkylphenol ethoxylate metabolites in the aquatic environment using liquid chromatography-electrospray mass spectrometry*. Anal. Chem. 72; 4322-4330, 2000.
- ²²¹ Castillo M., Martínez E., Ginebreda A., Tirapu L., Barceló D., *Determination of non-ionic surfactants and polar degradation products in influent and effluent water samples and sludges of sewage treatment plants by a generic solid-phase extraction protocol*. Analyst 125; 1733-1739, 2000.
- ²²² Hale R.C., Smith C.L., de Fur P.O., Harvey E., Bush E.O., La Guardia M.J., Vadas G.G., *Nonylphenols in sediments and effluents associated with diverse wastewater outfalls*. Environ. Toxicol. Chem. 19; 946-952, 2000.
- ²²³ Valsecchi S., Polesello S., Cavalli S., *Recovery of 4-nonylphenol and 4-nonylphenol ethoxylates from river sediments by pressurised liquid extraction*. J. Chrom. A 925; 297-301, 2001.

Tabla 1.9. Métodos de extracción de SPC, AP, APEO y AEO en matrices medioambientales sólidas o semisólidas. (cont.)

Analitos	Matriz	Extracción	Tiempo	Ref.
LAS (C ₁₀ -C ₁₃) SPC (C ₂ -C ₅ , C ₈ , C ₁₀ , C ₁₁)	Fangos	Ultrasonidos	3x20 min	224
NP _n EO, OP _n EO, n=9 BrNP, XN ₁₋₂ PEC, XNP ₁₋₂ EO, X= Cl, Br	Fangos Sedimentos	Ultrasonidos	3x20 min	225
NPNP ₁₋₁₅ EO	Sedimentos	Ultrasonidos (flujo continuo de disolvente a elevada T ^a)	10 min	226
4-NP, 4-t-OP, AP ₁₋₁₆ EO NP ₁₋₂ EC	Mejillones	Ultrasonidos	20 min	227
LAS (C ₁₀ -C ₁₃) SPC totales	Sedimentos	Soxhlet	12 h	228
LAS (C ₁₀ -C ₁₄) SPC (C ₃ -C ₆ , C ₈ -C ₁₃)	Sedimentos	Soxhlet	12 h	229

- ²²⁴ Riú J., Martínez E., Barceló D., Ginebreda A., Tirapu LI., *LC-MS determination of Linear Alkylbenzene Sulfonates and their carboxylic degradation products in influent and effluent water samples and sludges from sewage-treatment plants*. Fresenius J. Anal. Chem. 371; 448-455, 2001.
- ²²⁵ Petrovic M., Díaz A., Ventura F., Barceló D., *Simultaneous determination of halogenated derivatives of alkylphenol ethoxylates and their metabolites in sludges, river sediments, and surface, drinking, and wastewaters by liquid chromatography-mass spectrometry*. Anal. Chem. 73; 5886-5895, 2001.
- ²²⁶ Ferguson P.L., Iden C.R., Brownawell, B.J., *Analysis of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in environmental samples by mixed-mode high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry*. J. Chrom. A 938; 79-91, 2001.
- ²²⁷ Cathum, S., Sabik, H., *Simultaneous determination of alkylphenol polyethoxylate surfactants and their degradation products in water, effluent and mussel using gas chromatography-mass spectrometry*. Chromatographia 53; 400-405, 2001.
- ²²⁸ Akyuz M., Roberts D.J., *Determination of Linear Alkylbenzene Sulphonates and their biodegradation intermediates by isocratic RP-HPLC*. Turk. J. Chem. 26; 669-679, 2002.
- ²²⁹ León V.M., Sáez M., Gonzalez-Mazo E., Gómez-Parra A., *Ocurrence and distribution of Linear Alkylbenzene Sulfonates and Sulfophenylcarboxylic Acids in several Iberian littoral ecosystems*. Sci. Total Environ. 288; 215-226, 2002.

Tabla 1.9. Métodos de extracción de SPC, AP, APEO y AEO en matrices medioambientales sólidas o semisólidas. (cont.)

Analitos	Matriz	Extracción	Tiempo	Ref.
OP, NP, OP ₁₋₅ EO, NP ₁₋₅ EO	Sedimentos Carpa	PLE		230,231
4-NP, 4-t-OP, NP ₁₋₁₅ EO	Materia particulada, Fangos	PLE	2 ciclos de 5 min	232,233
OP, NP, OP ₁₋₅ EO, NP ₁₋₅ EO	Sedimentos	PLE	3 ciclos de 10 min	234
C ₁₀ EO ₆ , C ₁₂ EO ₄₋₈ , C ₁₄₋₁₆ EO ₆ , alquilaminas etoxiladas	Suelos agrícolas	PLE	3 ciclos 5 min	235
C _{12,14,16,18} EO _n n = 10	Fangos	Soxhlet	4-6 h	236

- ²³⁰ Datta S., Loyo-Rosales J.E., Rice C.P., *A Simple Method for the determination of trace levels of Alkylphenolic compounds in fish tissue using Pressurized Fluid Extraction, Solid Phase Clean-up, and High-Performance Liquid Chromatography Fluorescence Detection*. J. Agric. Food Chem. 50; 1350-1354, 2002.
- ²³¹ Rice C.P., Schmitz-Afonso I., Loyo-Rosales J.E., Link E., Thoma R., Fay L., Altfather D., Camp M.J., *Alkylphenol and alkylphenol-ethoxylates in carp, water, and sediment from the Cuyahoga River, Ohio*. Environ. Sci. Technol. 37; 3747-3754, 2003.
- ²³² Petrovic M., Lacorte S., Viana P., Barcelo D., *Pressurized Liquid extraction followed by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry for the determination of Alkylphenolic compounds in river sediment*. J. Chrom. A 959; 15-23, 2002.
- ²³³ Céspedes R., Lacorte S., Ginebreda A., Barceló D., *Occurrence and fate of Alkylphenols and Alkylphenol ethoxylates in sewage treatment plants and impact on receiving waters along the Ter river (Catalonia, NE Spain)*. Environ. Pollut. 153; 384-392, 2008.
- ²³⁴ Loyo-Rosales J.E., Schmitz-Afonso I., Clifford P.R., Torrents A., *Analysis of octyl- and nonylphenol and their ethoxylates in water and sediments by liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. Anal. Chem. 75; 4811-4817, 2003.
- ²³⁵ Krogh K.A., Mogensen B.B., Halling-Sorensen B., Cortés A., Vejrup K.V., Barceló D., *Analysis of alcohol ethoxylates and alkylamine ethoxylates in agricultural soils using pressurised liquid extraction and liquid chromatography-mass spectrometry*. Anal. Bioanal. Chem. 376; 1089-1097, 2003.
- ²³⁶ Matthijs E., Burford M.D., Cassani G., Comber M.H.I., Eadsforth C.V., Haas P., Klotz H., Spilker R., Waldhoff H., Wingen H.P., *Determination of alcohol ethoxylate components in sewage sludge*. Tenside, Surfactants, detergents 41; 113-120, 2004.

Tabla 1.9. Métodos de extracción de SPC, AP, APEO y AEO en matrices medioambientales sólidas o semisólidas. (cont.)

Analitos	Matriz	Extracción	Tiempo	Ref.
LAS (C ₁₀ -C ₁₃) SPC (C ₅ -C ₁₃)	Suelos enmendados con fangos	PLE	3 ciclos 5 min	237
NP, OP, OPEO	Pescado, Crustáceos	Agitación con acetona/hexano		238
C _{12,14,16} EO _n n=12,2, LAS, NPEO, AES	Sedimentos	PLE	3 ciclos	239
LAS, AESs, APEO, AEO, SPC (2C ₂ - 13C ₁₃), AP, APECs	Sedimentos	PLE	3 ciclos 5 min	240
NP, OP, BP, n-NP ₁₋₂ EO	Carne Pescado	Agitación con ACN	2x8 min	241
C _{12,13,14,15,16,18} EO ₀₋₂₃	Sedimentos	Ultrasonidos	2x5 min	242

- ²³⁷ Eichhorn P., López O., Barceló D., *Application of Liquid Chromatography-Electrospray-tandem Mass Spectrometry for the identification and characterisation of Linear Alkylbenzene Sulfonates and Sulfohenyl Carboxylates in sludge-amended soils*. J. Chrom. A 1067; 171-179, 2005.
- ²³⁸ Ferrara F., Fabietti F., Delise M., Funari E., *Alkylphenols and alkylphenol ethoxylates contamination of crustaceans and fishes from the Adriatic Sea (Italy)*. Chemosphere 59; 1145-1150, 2005.
- ²³⁹ Lara-Martín P., Gómez-Parra A., González-Mazo E., *Pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of major surfactants in marine sediments*. Intern. J. Environ. Anal. Chem. 85; 293-303, 2005.
- ²⁴⁰ Lara-Martín P.A., Petrovic M., Gómez-Parra A., Barceló D., González-Mazo E., *Presence of surfactants and their degradation intermediates in sediment cores and grabs from the Cadiz Bay area*. Environ. Pollut. 144; 483-491, 2006.
- ²⁴¹ Mao I.F., Lu Y.Y., Chen M.L., *A simplified method for simultaneous quantification of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates in meat and fish using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection*. Intern. J. Environ. Anal. Chem. 86; 713-722, 2006.
- ²⁴² Dyer S.D., Sanderson H., Waite S.W., Van Compernelle R., Price B., Nielsen A.M., Decarvalho A.J., Hooton D.J., Sherren Andrew A.J., *Assessment of alcohol ethoxylate surfactants and fatty alcohols mixtures in river sidiments and prospective risk assessment*. Environ. Monit. Assess. 120; 46-63, 2006.

Tabla 1.9. Métodos de extracción de SPC, AP, APEO y AEO en matrices medioambientales sólidas o semisólidas. (cont.)

Analitos	Matriz	Extracción	Tiempo	Ref.
NP, OP, NP ₁ EC, NP ₁₋₁₆ EO OP ₁₋₅ EO	Materia en suspensión Sedimentos	Soxhlet PLE	8 h (3x10 min).	243
4-n-NP, NP ₁₋₂ EO, BPA, TCS	Fangos	Ultrasonidos	30 min	244
NP, NP ₁₋₂ EO, DEHP, PCBs	Fangos	Ultrasonidos	2x15 min	245
OP, NP, NP ₁₋₁₅ EO, OP ₁₋₁₅ EO, C _x EO ₆ (x= 8, 10, 12, 14, 16)	Suelos tratados con fangos	PLE	2 ciclos de 5 min	246

8.1 Extracción con disolventes presurizados

Para facilitar la extracción de los analitos de interés en matrices sólidas, en esta tesis, se utilizó la extracción con líquidos presurizados (PLE). A

²⁴³ Loyo-Rosales J.E., Rice C.P., Torrents A., *Octyl and Nonylphenol Ethoxylates and Carboxylates in wastewater and sediments by Liquid Chromatography/tandem Mass Spectrometry*. Chemosphere 68; 2118-2127, 2007.

²⁴⁴ Gatidou, G., Thomaidis, N.S., Stasinakis, A.S., Lekkas, T.D., *Simultaneous determination of the endocrine disrupting compounds nonylphenol, nonylphenol ethoxylates, triclosan and bisphenol A in wastewater and sewage sludge by gas chromatography-mass spectrometry*. J. Chrom. A, 1138; 32-41, 2007.

²⁴⁵ Aparicio I., Santos J.L., Alonso E., *Simultaneous sonication-assisted extraction, and determination by gas chromatography-mass spectrometry, of di-(ethylhexyl)phthalate, nonylphenol, nonylphenol ethoxylates and polychlorinated biphenyls in sludge from wastewater treatment plants*. Anal. Chim. Acta 584; 455-461, 2007.

²⁴⁶ Andreu V., Ferrer E., Rubio J.L., Font G., Picó Y., *Quantitative determination of Octylphenol, Nonylphenol, Alkylphenol ethoxylates and Alcohol ethoxylates by Pressurized Liquid Extraction and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in soils treated with sewage sludges*. Sci. Total Environ. 378; 124-129, 2007.

continuación, se resume brevemente el fundamento y aplicaciones de esta técnica.

Existen diferentes denominaciones para esta técnica: extracción acelerada con disolventes (ASE), extracción con fluidos presurizados (PFE), extracción con líquidos presurizados (PLE), extracción con disolventes calientes presurizados (PHSE), extracción con disolventes a elevada presión (HPSE), extracción con disolventes a elevadas presiones y elevadas temperaturas (HHPSE) y extracción subcrítica con disolventes (SSE).

El uso de tan variada terminología puede dar lugar a confusión por lo que en esta tesis se usará la designación PLE que es la más ampliamente aceptada.

Por último, es importante destacar que cuando se emplea agua como disolvente de extracción, los autores tienden a usar una terminología diferente para resaltar el uso de este disolvente no agresivo con el medio ambiente. Así se usan términos como extracción con agua subcrítica (SWE), extracción con agua caliente (HWE), extracción con agua caliente presurizada (PHWE) y extracción con agua a elevadas temperaturas (HTWE).

En la extracción con líquidos presurizados la muestra se pone en contacto con el disolvente empleado para la extracción a elevadas presiones y temperaturas (por encima del punto de ebullición del disolvente). Al trabajar con temperaturas elevadas se mejora la solubilidad de los analitos en el disolvente y se aumenta las cinéticas de desorción de los mismos en la matriz donde se encuentran.

La PLE puede llevarse a cabo en dos modos: estático y dinámico. En el modo estático, la muestra y el disolvente se mantienen durante un tiempo programado por el usuario, a una presión y temperatura constantes, mientras que en el modo dinámico, el disolvente fluye a través de la muestra de una forma continua. En la mayoría de los casos el modo dinámico usa agua como disolvente de extracción. Algunos estudios han demostrado que la combinación de ambos modos puede mejorar la eficiencia de las extracciones.

Algunas de las *ventajas* que presenta esta técnica de extracción son:

- Es más rápida que los procedimientos de extracción convencionales con líquidos (< 15 min) y emplea menos disolvente.
- Permite extracciones eficaces independientemente de la matriz.
- Es automatizable y permite extraer muestras secuencialmente.

Sin embargo presenta una serie de *inconvenientes* como son:

- Aunque las extracciones son eficaces son poco selectivas.
- Requiere el empleo de temperaturas elevadas (más altas que en SFE).
- El equipo tiene un precio elevado.

Si comparamos la PLE con otra técnica de extracción reciente como es la extracción asistida con microondas (MAE), nos encontramos que la primera presenta la ventaja de que no requiere etapas adicionales de filtración puesto que la matriz queda separada del disolvente usado en la extracción. Este punto es importante desde el punto de vista de llevar a cabo una automatización del proceso y acoplamiento on-line con alguna técnica separativa.

Desde su introducción en el mercado en 1996²⁴⁷, sus aplicaciones se han focalizado en la extracción de contaminantes ambientales presentes en suelos, sedimentos, fangos y cenizas de pescado. Debido a las ventajas que presenta como la disminución en el volumen de disolvente consumido y en el tiempo de extracción, recientemente se está introduciendo en muy diferentes áreas como la Biología, análisis farmacéutico y la industria alimenticia.

8.1.1 - Pretratamiento de la muestra

Antes de introducir la muestra en la célula de extracción es necesario llevar a cabo un pretratamiento. Este proceso generalmente consiste en una molienda y posterior tamizado ya que la difusión de los analitos de la matriz al disolvente aumenta considerablemente al reducir el tamaño de partícula.

²⁴⁷ Richter B.E., Jones B.A., Ezzell J.L., Porter N.L., Avdalovic N., Phol C., *Accelerated Solvent Extraction: A Technique for Sample Preparation*. Anal. Chem. 68; 1033-1039, 1996.

El secado de la muestra es también importante ya que la humedad puede disminuir considerablemente la eficiencia del procedimiento de extracción. El secado se hace especialmente importante cuando se usan disolventes no polares en la extracción de los analitos, en estos casos es habitual incorporar algún desecante en la célula de muestra. Algunos de los agentes desecantes empleados con este propósito son el sulfato sódico, tierra de diatomeas o la celulosa. Otras alternativas incluyen el empleo de hornos a presión o secado mediante congelación o liofilización, aunque estas no son recomendables en el caso de compuestos volátiles. El uso de disolventes más polares (acetonitrilo, metanol, acetato de etilo, etc.) o mezcla de disolventes (hexano/acetona, hexano/acetonitrilo, etc.) hace que la etapa de secado sea menos crucial.

8.1.2 - Optimización del procedimiento de extracción

El procedimiento comienza con la elección del disolvente de extracción. El disolvente de extracción debe ser capaz de solubilizar los analitos de interés, minimizando la coextracción de otros componentes de la matriz. En la elección del disolvente es muy importante tener en cuenta la compatibilidad con las siguientes etapas de tratamiento de muestra como podrían ser limpieza, preconcentración o la técnica analítica que se vaya a emplear. También se debe considerar la volatilidad del mismo si fuera necesaria una concentración del extracto.

La polaridad del disolvente de extracción debería ser parecida a la de los compuestos de interés, de tal forma que para llevar a cabo la extracción de compuestos apolares y lipofílicos es frecuente el uso de disolventes no polares y disolventes inmiscibles en agua tales como hexano,

pentano, etc. o combinaciones de disolventes no polares con disolventes de polaridad intermedia, como pentano/diclorometano, o ciclohexano/acetato de etilo. Del mismo modo, para llevar a cabo la extracción de compuestos hidrofílicos y polares, se emplean disolventes más polares como acetonitrilo, metanol, acetato de etilo o agua.

En el caso de que los analitos de interés cubran un amplio rango de polaridades, las mezclas de disolventes de baja y alta polaridad suelen dar lugar a extracciones más eficaces. Algunos autores han desarrollado otra estrategia para la extracción de analitos con un amplio rango de polaridades; ésta consiste en llevar a cabo dos extracciones PLE: una con un disolvente no polar para extraer los compuestos menos polares, y una segunda con un disolvente más polar para extraer los analitos más polares^{248,249}.

En modo estático es frecuente usar disolventes orgánicos puros o mezclas. Es poco frecuente el uso de agua para llevar a cabo estas extracciones^{250,251,252}. Sin embargo, es el disolvente tradicionalmente

²⁴⁸ Waksmundzka M., Petruczynik A., Dragan A., Wianowska D., Dawidowicz A.L., Sowa I., *Influence of the extraction mode on the yield of some furanocoumarins from *Pastinaca sativa* fruits*. J. Chrom. B 800; 181-187, 2004.

²⁴⁹ Klejdus B., Vacek J., Adam V., Zehnalek J., Kizek R., Trnkova L., Kuban V., *Determination of isoflavones in soybean food and human urine using liquid chromatography with electrochemical detection*. J. Chrom. B 806; 101-111, 2004.

²⁵⁰ Schmidt A.C., Reisser W., Mattusch J., Popp P., Wennrich R., *Evaluation of extraction procedures for the ion chromatographic determination of arsenic species in plant materials*. J. Chrom. A 889; 83-91, 2000.

²⁵¹ Vela N.P., Heitkemper D.T., Stewart, K.R., *Arsenic extraction and speciation in carrots using accelerated solvent extraction, liquid chromatography and plasma mass spectrometry*. The Analyst 126; 1011-1017, 2001.

²⁵² Gallagher P.A., Murray S., Wei X., Schwegel C.A., Creed J.T., *An evaluation of sample dispersion media used with accelerated solvent extraction for the extraction and recovery of arsenicals from LFB and DORM-2*. J. Anal. At. Spectrom. 17; 581-586, 2002.

empleado para llevar a cabo extracciones en modo dinámico

253,254,255,256,257,258,259,260,261,262,263,264,265,266

-
- ²⁵³ Ammann A., Hinz D.C., Addleman R.S., Wai C.M., Wenclawiak B.W., *Superheated water extraction, steam distillation and SFE of peppermint oil*. Fresenius J. Anal. Chem. 364; 650-653, 1999.
- ²⁵⁴ Jiménez-Carmona M.M., Ubers J.L., Luque de Castro M.D., *Comparison of continuous subcritical water extraction and hydrodistillation of marjoram essential oil*. J.Chrom. A 855; 625-632, 1999.
- ²⁵⁵ Suomi J., Siren H., Hartonen K., Riekkola M.L., *Extraction of iridoid glycosides and their determination by micellar electrokinetic capillary chromatography*. J. Chrom. A, 868; 73-83, 2000.
- ²⁵⁶ Kubátová A., Millar D.J., Hawthorne S.B., *Comparison of subcritical water and organic solvents for extracting kava lactones from kava root*. J. Chrom. A 923; 187-194, 2001.
- ²⁵⁷ Kubátová A., Lagadec A.J.M., Miller D.J., Hawthorne S.B., *Selective extraction of oxygenates from savory and peppermint using subcritical water*. Flavour Fragr. J. 16; 64-73, 2001.
- ²⁵⁸ Soto-Ayala R., Luque de Castro M.D., *Continuous subcritical water extraction as a useful tool for isolation of edible essential oils*. Food Chem. 75; 109-113, 2001.
- ²⁵⁹ Ollanketo M., Peltoketo A., Hartonen K., Hiltunen R., Riekkola M.L., *Extraction of sage (Salvia officinalis L.) by pressurized hot water and conventional methods: antioxidant activity of the extracts*. Eur. Food. Res. Technol. 215; 158-163, 2002.
- ²⁶⁰ Ong E.S., Len S.M., *Pressurized hot water extraction of berberine, baicalin and glycyrrhizin in medicinal plants*, Anal. Chim. Acta 482; 81-89, 2003.
- ²⁶¹ Ibáñez E., Kubatova A., Señoráns F.J., Cavero S., Reglero G., Hawthorne S.B., *Subcritical Water Extraction of Antioxidant Compounds from Rosemary Plants*. J. Agric. Food. Chem. 51; 375-382, 2003.
- ²⁶² Ozel M.Z., Gogus F., Lewis A.C., *Subcritical water extraction of essential oils from Thymbra spicata*. Food Chem. 82; 381-386, 2003.
- ²⁶³ Bogialli S., Curini R., Di Corcia A., Lagana A., Nazzari M., Tonci M., *Simple and rapid assay for analyzing residues of carbamate insecticides in bovine milk: hot water extraction followed by liquid chromatography–mass spectrometry*. J. Chrom. A 1054; 351-357, 2004.
- ²⁶⁴ Deng C.H., Li N., Zhang X.M., *Rapid determination of essential oil in Acorus tatarinowii Schott by pressurized hot water extraction followed by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry*. J. Chrom. A 1059; 149-155, 2004.
- ²⁶⁵ Bogialli S., Curini R., Di Corcia A., Lagana A., Mele M., Nazzari M., *Simple confirmatory assay for analyzing residues of aminoglycoside antibiotics in bovine milk: hot water extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. J. Chrom. A 1067; 93-100, 2005.
- ²⁶⁶ Deng C.H., Yao N., Wang A., Zhang X.M., *Determination of essential oil in a traditional Chinese medicine, Fructus amomi by pressurized hot water extraction followed by liquid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry*. Anal. Chim. Acta 536; 237-244, 2005.

Algunos autores han logrado mejorar el proceso de extracción mediante la adición de modificadores al disolvente de extracción. Así se ha llevado a cabo la extracción de PAHs en tejidos de pescado mediante agua modificada con el tensioactivo dodecil sulfato sódico (SDS)²⁶⁷. También se han añadido pequeñas proporciones de disolventes orgánicos al agua, tales como metanol, acetona o acetonitrilo, para disminuir su constante dieléctrica y por tanto su polaridad^{268,269,270,271}. Otros autores han optado por adicionar un ácido o base al agua para alterar el pH y mejorar de esta forma la eficiencia de la extracción²⁷². La adición de modificadores es menos frecuente en el caso de usar un disolvente orgánico para llevar a cabo la extracción PLE^{273,274,275}.

²⁶⁷ Morales-Muñoz S., Luque-García J.L., Luque de Castro, M.D., *Static extraction with modified pressurized liquid and on-line fluorescence monitoring Independent matrix approach for the removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental solid samples*. J. Chrom. A 978; 49-57, 2002.

²⁶⁸ Curren M.S., King J.W., *Ethanol-modified Subcritical Water Extraction combined with Solid-Phase Microextraction for determining Atrazine in beef kidney*. J. Agric. Food Chem. 49; 2175-2180, 2001.

²⁶⁹ Wennrich L., Popp P., Koller G., Breuste J., *Determination of Organochlorine Pesticides and Chlorobenzenes in Strawberries by Using Accelerated Solvent Extraction Combined with Sorptive Enrichment and Gas Chromatography/Mass Spectrometry*. J. AOAC Int. 84; 1194, 2001.

²⁷⁰ Wennrich L., Popp P., Koller G., Breuste J., *Determination of organochlorine pesticides and chlorobenzenes in fruit and vegetables using subcritical water extraction combined with sorptive enrichment and CGC-MS*. Chromatographia 53 (suppl.); 380-386, 2001.

²⁷¹ Gallagher P.A., Shoemaker J.A., Wei X., Brockhoff C.A., Creed J.T., *Extraction and detection of arsenicals in seaweed via accelerated solvent extraction with ion chromatographic separation and ICP-MS detection*. Fresenius J. Anal. Chem. 369; 71-80, 2001.

²⁷² Pecorelli I., Galarini R., Bibi R., Floridi A., Casciarri E., *Simultaneous determination of 13 quinolones from feeds using accelerated solvent extraction and liquid chromatography*. Anal. Chim. Acta 483; 81-89, 2003.

²⁷³ Wahlen R., Catterick T., *Simultaneous co-extraction of organometallic species of different elements by accelerated solvent extraction and analysis by inductively coupled plasma mass spectrometry coupled to liquid and gas chromatography*. Rapid Commun. Mass Spectrom. 18; 211-217, 2004.

²⁷⁴ Wahlen R., McSheehy S., Seriver C., Mester Z., *Arsenic speciation in marine certified reference materials. Part 2. The quantification of water-soluble arsenic species by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry*. J. Anal. At. Spectrom. 19; 876-882, 2004.

²⁷⁵ Dionex Application Note, 326, 2000.

La optimización de las condiciones de extracción (tamaño de muestra, tamaño de partícula, volumen, naturaleza del disolvente, flujo del disolvente -en el caso de extracciones en modo dinámico-, temperatura, tiempo de extracción, número de ciclos y presión) suele llevarse a cabo normalmente mediante la clásica optimización univariante en la que se alteran los valores de una variable permaneciendo el valor del resto constante. Sin embargo recientemente han aparecido trabajos en los que la optimización de las condiciones de extracción se lleva a cabo mediante el uso de diseños experimentales^{276,277}.

De entre las variables que afectan a la PLE, la naturaleza del disolvente y la temperatura son generalmente las que ejercen la mayor influencia. Algunos estudios han demostrado que la presión es frecuentemente una variable poco influyente en el resultado de la eficiencia de extracción y es requerida únicamente para mantener el extractante en estado líquido.

8.1.3 - Lavado y enriquecimiento del extracto

A pesar de llevar a cabo una adecuada optimización de todos los parámetros que intervienen en la PLE para obtener un método selectivo, es frecuente encontrar en los extractos ciertos componentes de la matriz de alto peso molecular como son lípidos, pigmentos o resinas debiendo eliminarse para minimizar los efectos adversos que puedan afectar a la detección de los compuestos de interés. Por tanto se hace necesaria la

²⁷⁶ Holst C., Mueller, A., Serano F., Sporning S., Bjoerklund E., *Optimisation of Pressurized Liquid Extraction for the Determination of Seven Selected Polychlorinated Biphenyls in Feed Samples*. *Chromatographia* 61; 391-396, 2005.

²⁷⁷ Pallaroni L., von Holst C., *Determination of zearalenone from wheat and corn by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-electrospray mass spectrometry*. *J. Chrom. A* 993; 39-45, 2003.

eliminación de componentes coextraídos de la matriz y para ello se han desarrollado diferentes procedimientos de limpieza del extracto.

Los compuestos coextraídos suelen retirarse mediante etapas de lavado llevadas a cabo después del procedimiento de extracción. Recientemente muchos esfuerzos se están focalizando en la automatización de la etapa de limpieza y en el desarrollo de etapas de lavado in-situ durante la extracción. Tradicionalmente se han realizado procedimientos de limpieza basados en columnas de adsorción usando florisil, alúmina neutra o sílica gel, especialmente con muestras grasas en las que se necesita eliminar los lípidos coextraídos.

Para evitar tediosos procedimientos de limpieza de los extractos antes de llevar a cabo el análisis y aumentar así las posibilidades de automatización, recientemente algunos trabajos se han centrado en el desarrollo de métodos de limpieza in-situ. En el caso de muestras grasas se ha conseguido eliminar el problema in-situ mediante la adición a la célula de extracción de rellenos que retienen los lípidos impidiendo que pasen al extracto. Con este fin se ha empleado florisil, alúmina, sílica gel, 2-3 hidroxipropoxipropil sílica, cianopropil sílica o sílica gel impregnada con ácido sulfúrico.

Otros autores han conseguido minimizar la presencia de interferentes de la matriz en el extracto mediante la aplicación de una PLE preliminar con un disolvente no polar, con el objetivo de eliminar los compuestos hidrofóbicos presentes en la muestra (grasa, resinas, aceites, clorofila,

etc.) antes de llevar a cabo la extracción de los compuestos de interés.
278,279,280,281

El uso de la PLE en la extracción de compuestos traza suele involucrar una etapa de preconcentración del extracto por lo que el proceso de limpieza también sirve frecuentemente como técnica de preconcentración del analito.

En el resto de los casos se lleva a cabo una preconcentración o enriquecimiento del extracto aplicando alguna de las siguientes técnicas: extracción líquido-líquido (LLE)²⁸², extracción en fase sólida (SPE)^{283,284,285,286,287} y microextracción en fase sólida (SPME)^{268,279,270}.

²⁷⁸ McKiernan J.W., Creed J.T., Brockhoff C.A., Caruso J.A., Lorenzana R.M., *A comparison of automated and traditional methods for the extraction of arsenicals from fish*. J. Anal. At. Spectrom. 14; 607-613, 1999.

²⁷⁹ Draisci R., Marchiafava C., Palleschi L., Cammarata P., Cavalli S., *Accelerated solvent extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry quantitation of corticosteroid residues in bovine liver*. J. Chrom. B 753; 217-223, 2001.

²⁸⁰ Papagiannopoulos M., Mellenthin A., *Automated sample preparation by pressurized liquid extraction-solid-phase extraction for the liquid chromatographic-mass spectrometric investigation of polyphenols in the brewing process*. J. Chrom. A 976; 345-348, 2002.

²⁸¹ Hooijerink H., van Bennekom E.O., Nielen M.W.F., *Screening for gestagens in kidney fat using accelerated solvent extraction and liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry*. Anal. Chim. Acta 483; 51-59, 2003.

²⁸² Pawlowski T.M., Poole C.F., *Extraction of Thiabendazole and Carbendazim from Foods Using Pressurized Hot (Subcritical) Water for Extraction: A Feasibility Study*. J. Agric. Food Chem. 46; 3124-3132, 1998.

²⁸³ Chuang J.C., Hart K., Chang J.S., Boman L.E., van Emon J.M., Reed A.W., *Evaluation of analytical methods for determining pesticides in baby foods and adult duplicate-diet samples*. Anal. Chim. Acta 444; 87-95, 2001.

²⁸⁴ Schmitz-Alonso I., Loyo-Rosales J.E., de la Paz-Aviles M., Rattner B.A., Rice C.P., *Determination of alkylphenol and alkylphenolethoxylates in biota by liquid chromatography with detection by tandem mass spectrometry and fluorescence spectroscopy*. J. Chrom. A 1010; 25-35, 2003.

²⁸⁵ Haib J., Hofer I., Renaud J.M., *Analysis of multiple pesticide residues in tobacco using pressurized liquid extraction, automated solid-phase extraction clean-up and gas chromatography-tandem mass spectrometry*. J. Chrom. A 1020; 173-187, 2003.

²⁸⁶ Álvarez D., Sáez M., Lara P.A., Gómez-Parra E., González-Mazo E., *New extraction method for the analysis of linear alkylbenzene sulfonates in marine organisms*.

Esta etapa de lavado y preconcentración se hace totalmente necesaria cuando se lleva a cabo una PLE en el modo dinámico ya que se obtienen volúmenes grandes de disolvente extractante apareciendo los analitos muy diluidos en el extracto.

8.1.4 - Aplicaciones analíticas

En la **Tabla 1.10** se recogen aplicaciones que usan extracción con disolventes presurizados para llevar a cabo la extracción en diferentes muestras sólidas ambientales y las condiciones de extracción empleadas (disolvente, temperatura, presión, y tiempo de extracción) en cada caso.

Pressurized liquid extraction versus Soxhlet extraction. J. Chrom. A 1052; 33-38, 2004.

²⁸⁷ Papagiannopoulos M., Wollseifen H.R., Mellenthin A., Haber B., Galesa R., *Identification and Quantification of Polyphenols in carob fruits (Ceratonia siliqua L.) and derived products by HPLC-UV-ESI/MS.* J. Agric. Food. Chem. 52; 3784-3791, 2004.

Tabla 1.10 - Distintas aplicaciones de la extracción PLE en muestras sólidas ambientales.

Analito	Matriz	Masa de muestra	Condiciones de extracción	Análisis	Ref.
PAHs, fenoles, PCBs, TPHs	Suelo	0.1-2 g.	Hexano T ^a : 50-150 °C P: 1500 psi t _{extracción} : 5 min	GC-MS	288
PAHs	Suelo	2 g.	DCM:Acetona (1:1 v/v) T ^a : 100 °C P: 2000 psi t _{extracción} : 5 min	–	289
PAHs	Sedimentos	5-10 g.	Hexano:Acetona (1:1 v/v) T ^a : 100 °C P: 2000 psi t _{extracción} : 5 min	LC	290
PCBs	Fangos, ostras, sedimentos, suelo	5-10 g	Hexano:Acetona (1:1 v/v) T ^a : 100 °C P: 1500 psi t. extracción: 5 min	GC-ECD	291
PCBs	Pescado	3 g	Hexano T ^a : 100 °C P: 1500 psi t _{extracción} : 5 min	GC-ECD	292
OPPs	Suelo	10-20 g	DCM:Acetona (1:1 v/v) T ^a : 100 °C P: 2000 psi t _{extracción} : 5 min	GC-NPC GC-ECD	293

²⁸⁸ Li K., Landriault M., Fingas M., Llompart M., *Accelerated Solvent Extraction (ASE) of Environmental Organic Compounds in soils using Supercritical Fluid Extractor. Proceedings of the Fifteenth Technical Seminar on Chemical Spills, Environment Canada, Ottawa, Ontario*, pp 115, 1990.

²⁸⁹ Dean J.R., *Accelerated solvent extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soil*. Anal. Commun. 33; 191-192, 1996.

²⁹⁰ Jensen D., Hoffer F., Ezzell J., Richter B., *Rapid Preparation of Environmental Samples by Accelerated Solvent Extraction (ASE)*. Polycyclic Aromatic Compounds 9; 233-240, 1996.

²⁹¹ *Extraction of PBBs from Environmental Samples using Accelerated Solvent Extraction (ASE)*. Application Note 316, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, LPN 0764 5M 4/96.

²⁹² *Selective Extraction of PBBs from Fish Tissue using Accelerated Solvent Extraction (ASE)*. Application Note 322, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, LPN 0764 5M 4/96.

²⁹³ *Extraction of Organophosphorus Pesticides using Accelerated Solvent Extraction (ASE)*. Application Note 319, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, LPN 0764 5M 4/96.

Tabla 1.10 - Distintas aplicaciones de la extracción PLE en muestras sólidas ambientales. (cont.)

Analito	Matriz	Masa de muestra	Condiciones de extracción	Análisis	Ref.
OCPs	Suelo	10-20 g	Hexano:Acetona (1:1 v/v) T ^a : 100 °C P: 1500 psi t _{extracción} : 5 min	GC-MS GC-ECD	294
BNA	suelo	10 g	DCM:Acetona (1:1 v/v) T ^a : 100 °C P: 2000 psi t _{extracción} : 5 min	GC-MS	294
Herbicidas	Suelo	10-20 g	DCM:Acetona (1:2 v/v) con 4 % (v/v) H ₃ PO ₄ /H ₂ O (1:1) T ^a : 100 °C P: 2000 psi t _{extracción} : 5 min	GC-NPC GC-ECD	295
BNAs	suelo	10-28 g	Agua destilada T ^a : 100 °C P: 1500 psi t _{extracción} : 5-25 min	NMR	295
PCDDs, PCDFs	Polvo urbano, ceniza de chimenea	4-10 g	Tolueno T ^a : 105 °C P: 2000 psi t _{extracción} : 5 min	GC-MS	296
PAHs	Suelo	7 g.	DCM:Acetona (1:1 v/v) T ^a : 100 °C P: 2000 psi t _{extracción} : 5 min	GC-FID	297

²⁹⁴ *Extraction of Chlorinated Pesticides using Accelerated Solvent Extraction (ASE)*. Application Note 320, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, LPN 0764 5M 4/96.

²⁹⁵ *Extraction of Chlorinated Herbicides using Accelerated Solvent Extraction (ASE)*. Application Note 318, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, LPN 0764 5M 4/96.

²⁹⁶ *Extraction of Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins and Polychlorinated Dibenzofurans from Environmental Samples using Accelerated Solvent Extraction (ASE)*. Application Note 323, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, LPN 0764 5M 4/96.

²⁹⁷ Saim N., Dean J.R., Abdullah M.P., Zakaria Z., *Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soil using Soxhlet extraction, pressurised and atmospheric microwave-assisted extraction, supercritical fluid extraction and accelerated solvent extraction*. J. Chrom. A 791; 361-366, 1997.

Tabla 1.10 - Distintas aplicaciones de la extracción PLE en muestras sólidas ambientales. (cont.)

Analito	Matriz	Masa de muestra	Condiciones de extracción	Análisis	Ref.
APEO, LASS, AP	sedimentos	1 g	Metanol T ^a : 100 °C P: 2200 psi t _{extracción} : 10 min	LC	298
Fenoles	suelo	0.5 g	DCM T ^a : 30-70 °C P: 600-3000 psi t _{extracción} : 5-25 min	LC	298
PAHs	Suelo	7 g.	DCM:Acetona (1:1 v/v) T ^a : 100 °C P: 2000 psi t _{extracción} : 5 min	GC-MS	299
BNAs	suelo, sedimentos, fangos	2.5 g	Acetato sódico 1M/Ácido acético 1 M en MeOH T ^a : 100 °C t _{extracción} : 5 min 3 ciclos	GC-MS	299
PAHs, OCPs	Suelo, arcilla	10 g.	DCM:Acetona (1:1 v/v) T ^a : 100 °C P: 1500 psi t _{extracción} : 10 min	-	300
PAHs, Pesticidas, Dioxinas, Furanos	Suelo	-	Hexano:Acetona (1:1 v/v) o tolueno T ^a : 100 °C P: 2200 psi t _{extracción} : 5 min	-	300

²⁹⁸ Kreisselmeier A., Dubeck H.W., *Determination of alkylphenols, alkylphenoethoxylates and linear alkylbenzenesulfonates in sediments by accelerated solvent extraction and supercritical fluid extraction*. J. Chrom. A 775; 187-196, 1997.

²⁹⁹ Saim N., Dean J.R., Abdullah M.P., Zakaria Z., *An Experimental Design Approach for the Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Highly Contaminated Soil Using Accelerated Solvent Extraction*. Anal. Chem. 70; 420-424, 1998.

³⁰⁰ Zuloaga O., Etxebarria N., Fernandez L.A., Madariaga J.M., *Comparison of accelerated solvent extraction with microwave-assisted extraction and Soxhlet for the extraction of chlorinated biphenyls in soil samples*. Trends Anal. Chem. 17; 642-647, 1998.

Tabla 1.10 - Distintas aplicaciones de la extracción PLE en muestras sólidas ambientales. (cont.)

Analito	Matriz	Masa de muestra	Condiciones de extracción	Análisis	Ref.
PAHs, Pesticidas, BNAs, PCBs	Suelo, sedimentos	5-15 g.	DCM:Acetona (1:1 v/v) T ^a : 100 °C P: 2000 psi t _{extracción} : 5 min	LC	301
PAHs	Sedimentos de río	-	Tolueno T ^a : 100 °C P: 2000 psi t _{extracción} : 10 min 2 ciclos	GC-MS	302
Fenoles	sedimentos	-	Acetona T ^a : 120 °C P: 1800 psi t _{extracción} : 15 min 2 ciclos	GC-MS	302
PCBs, OCPs	Sedimentos	0.5-2 g.	Hexano:Acetona (1:1 v/v) T ^a : 100 °C t _{extracción} : 5 min	GC-ECD	303
APEO	Sedimentos marinos	15-25 g	Hexano:Acetona (1:1 v/v) T ^a : 100 °C P: 1500 psi	LC-ESI- MS	304
LASs	sedimentos	5 g	Metanol T ^a : 100 °C P: 2000 psi Extr. estática: 5 min Extr. dinámica: 20 min	GC-MS	305

³⁰¹ Kenny D.V., Olesik S., *Extraction of Lignite Coal Fly Ash for Polynuclear Aromatic Hydrocarbons: Modified and Unmodified Supercritical Fluid Extraction, Enhanced-Fluidity Solvents, and Accelerated Solvent Extraction*. J. Chrom. Sci. 36; 59-65, 1998.

³⁰² Porschmann J., Plugge J., *Extraction of polar and hydrophobic pollutants using accelerated solvent extraction (ASE)*. Fresenius J. Anal. Chem. 364; 643-644, 1999.

³⁰³ Bjorklund E., Bowadt S., Nilsson T., Mathiasson L., *Pressurized fluid extraction of polychlorinated biphenyls in solid environmental samples*. J. Chrom. A 836; 285-293, 1999.

³⁰⁴ Shang D.Y., Macdonald R.W., Ikononou M.G., *Persistence of Nonylphenol Ethoxylate Surfactants and Their Primary Degradation Products in Sediments from near a Municipal Outfall in the Strait of Georgia, British Columbia, Canada*. Environ. Sci. Technol. 33; 1366-1372, 1999.

³⁰⁵ Ding W.H., Fann J.C.H., *Determination of linear alkylbenzenesulfonates in sediments using pressurized liquid extraction and ion-pair derivatization gas chromatography-mass spectrometry*. Anal. Chem. Acta 408; 291-297, 2000.

8.2 Otras técnicas de extracción

8.2.1 - Extracción Soxhlet Convencional

Es el método tradicional de extracción. Consiste en mantener en contacto la muestra sólida con el disolvente extractante en ebullición. Este método presenta una serie de inconvenientes como son:

- Las extracciones son muy largas (12-24 h).
- Se gastan cantidades grandes de disolvente (300-500 mL).
- No es compatible con analitos termolábiles.
- Normalmente es necesaria una etapa final de preconcentración.

Aunque también presenta algunas ventajas:

- No es necesaria una filtración posterior.
- La extracción es independiente de la matriz.
- Baje costo del equipo.
- Las recuperaciones obtenidas suelen ser elevadas.

8.2.2 - Extracción asistida con ultrasonidos

El sonido puede ser definido como una vibración mecánica transmitida por un medio elástico, pudiendo caracterizarse, como cualquier onda, por su frecuencia y su intensidad.

En la especie humana el margen medio de audición es de 10-16.000 Hz. Las frecuencias superiores a 20.000 Hz se denominan ultrasonidos.

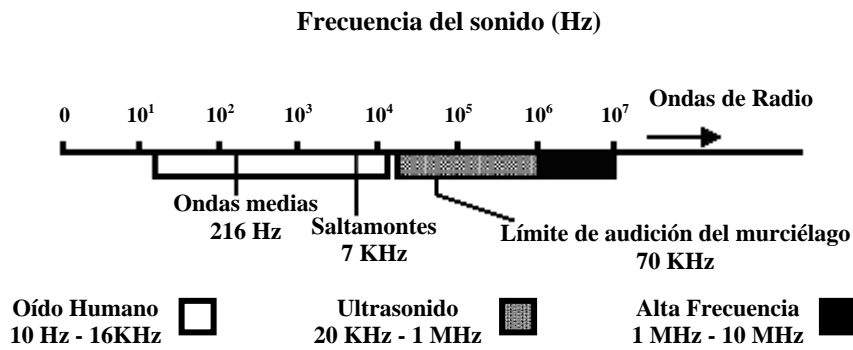


Figura 1.20 - Región de frecuencia del sonido

Las ondas sonoras provocan la contracción y posterior expansión del medio en el cual se propagan. Cuando este medio es un disolvente pueden formarse burbujas o cavidades en el líquido que terminen por explotar en un proceso que se conoce como cavitación. Estas burbujas explotan produciendo un incremento local de presión y temperatura muy notable que no es perceptible en el sistema como conjunto debido al pequeño tamaño de las burbujas.

La extracción mediante ultrasonidos presenta ciertas ventajas como son:

- El tiempo del proceso de extracción no suele ser elevado.
- Permite la extracción de analitos termolábiles.

- Puede permitir la adición de un coextractante para modificar la polaridad de la fase líquida^{306,307}.
- Bajo coste del equipo.
- Permite la extracción de una amplia variedad de compuestos, cualquiera que sea su polaridad, ya que puede emplear cualquier disolvente.

Sin embargo también presenta ciertas desventajas:

- Necesidad de filtrar y lavar después de la extracción, lo que supone un mayor consumo de disolvente y un mayor riesgo de pérdidas y/o contaminación del extracto durante su manipulación.
- El tamaño de partícula es un factor crítico.
- Poca precisión debido a que la distribución de energía ultrasónica no es uniforme en el baño de ultrasonido. Este inconveniente puede ser evitado mediante el uso de una sonda ultrasónica.

Básicamente, las aplicaciones del ultrasonido pueden ser divididas en: ensayos no destructivos y ensayos destructivos. Los primeros son aplicaciones del ultrasonido en frecuencias altas (por encima de 3 MHz) y generalmente se emplean para diagnósticos médicos. El ultrasonido destructivo es empleado principalmente en el campo de la química y física.

³⁰⁶ López-Avila V., Young R., Teplitzky N., *Microwave-assisted process as an alternative to soxhlet, sonication and supercritical fluid process*. J. AOAC Int. 79; 142-156, 1996.

³⁰⁷ Sporstoel S., Gjoes N., Carlberg G.E., *Extraction efficiencies for organic compounds in aquatic sediments*. Anal. Chim. Acta 151; 231-235, 1983.

8.2.3 - Extracción con fluidos supercríticos

Esta técnica usa un fluido supercrítico para extraer de forma rápida y selectiva analitos orgánicos de muestras complejas. Un fluido supercrítico es el estado físico de una sustancia que está por encima de su presión crítica (P_c) y temperatura crítica (T_c). El fluido supercrítico más usado es el CO_2 .

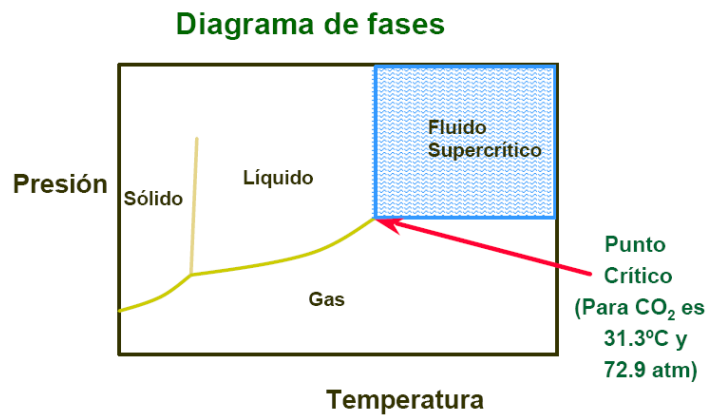


Figura 1.21 - Diagrama de fases. Punto crítico del CO_2

La extracción con fluidos supercríticos presenta las siguientes ventajas:

- El CO_2 no es tóxico ni inflamable ni reactivo y relativamente barato
- Se trabaja a temperaturas moderadas lo que permite la extracción de analitos termolábiles.
- Las extracciones suelen ser eficaces.
- Se obtiene un extracto concentrado y puro, libre de disolvente.
- La extracción es rápida y selectiva.

Pero también presenta inconvenientes como son:

- Elevado coste.
- Se trabaja a altas presiones.
- Se tiene “poco conocimiento del proceso” que tiene lugar.
- Se requiere personal altamente cualificado para la puesta en marcha y el mantenimiento.

8.2.4 - Extracción asistida con microondas

En este tipo de extracción los analitos se extraen aplicando energía microondas a la muestra en un disolvente adecuado. El calentamiento producido depende de la naturaleza química de la matriz y del disolvente usado. Cuanto mayor sea la constante dieléctrica del disolvente, mayor será la energía que absorba. Las ventajas que presenta esta técnica son:

- Es más rápida (30 segundos-15 minutos) y emplea menos disolvente (1-15 mL) que los procedimientos de extracción líquida tradicionales.
- La energía está localizada y por tanto el consumo es menor.
- Se pueden emplear tamaños de muestra variados.
- Es una técnica robusta y fácil de usar.
- Se puede llevar a cabo varias extracciones a la vez.
- No es necesario deshidratar o procesar la muestra.

Los inconvenientes que presenta son los siguientes:

- Plantea problemas de seguridad.
- Los disolventes que se pueden utilizar son limitados (conviene que no absorban la energía microondas).
- El extracto queda en contacto con la muestra al acabar la extracción, por tanto es necesaria una posterior filtración o separación.
- Es difícil de automatizar o acoplar a técnicas de análisis.
- No es compatible con analitos termolábiles.
- La extracción es poco selectiva.

8.3 Extracción en Fase Sólida

El proceso de tratamiento de muestras más complejas, que presentan gran cantidad de interferencias y necesitan niveles de detección muy bajos, comenzó a desarrollarse con la aparición de técnicas de preconcentración por extracción sólido-líquido con materiales adsorbentes. La introducción del uso de adsorbentes comerciales para extraer y purificar los analitos en disolución supuso un gran paso, ya que la utilización de esta técnica permite aislar, purificar y preconcentrar con éxito compuestos químicos de manera rápida y reproducible. Además, la extracción en fase sólida (SPE) no sólo evita las molestas emulsiones que se generan en muchos de los procesos de extracción líquido-líquido, sino que además es una técnica sencilla, económica y que consume una cantidad considerablemente menor de disolvente orgánico. Desde su primera aplicación en los años 50, la expansión de la SPE ha sido imparable, llegando a ser hoy en día una de las más utilizadas. Esto ha sido debido a la comercialización de formatos que han permitido la

automatización del proceso y a la síntesis de nuevos adsorbentes que han incrementado tanto la selectividad de la extracción como las posibles aplicaciones³⁰⁸.

8.3.1 - Fundamento de la Extracción en Fase Sólida

La SPE es una técnica de preparación de muestra que limpia y/o concentra muestras antes del análisis y, puede ser empleada de dos formas distintas:

- 1) La muestra pasa a través de un lecho de fase sólida que retiene los interferentes mientras que los analitos eluyen;
- 2) La muestra pasa a través de un lecho de fase sólida que retiene los analitos y, posiblemente, algunos interferentes. Estos se eliminan del lecho y después se eluyen los analitos. La elución puede ser realizada con un pequeño volumen de disolvente para concentrar la muestra, aumentando los límites de detección y simplificando el análisis. Este es el proceso más habitualmente usado.

Para su aplicación práctica se emplean dispositivos comerciales que contienen entre 50 y 1000 mg de partículas porosas. Cuando la disolución que contiene los analitos pasa a través del adsorbente activado, se produce una retención de éstos junto con algunos

³⁰⁸ Hennion M.C., *Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography*. J. Chrom. A 856; 3-54, 1999.

compuestos interferentes que contiene la muestra³⁰⁹. Seguidamente se realiza una etapa de lavado con la que se desorben los interferentes que hayan podido quedar retenidos. Por último, se eluyen los compuestos de interés mediante el paso del volumen necesario de una disolución adecuada.

En la **Figura 1.12** se representa un esquema general del procedimiento seguido en la extracción en fase sólida.

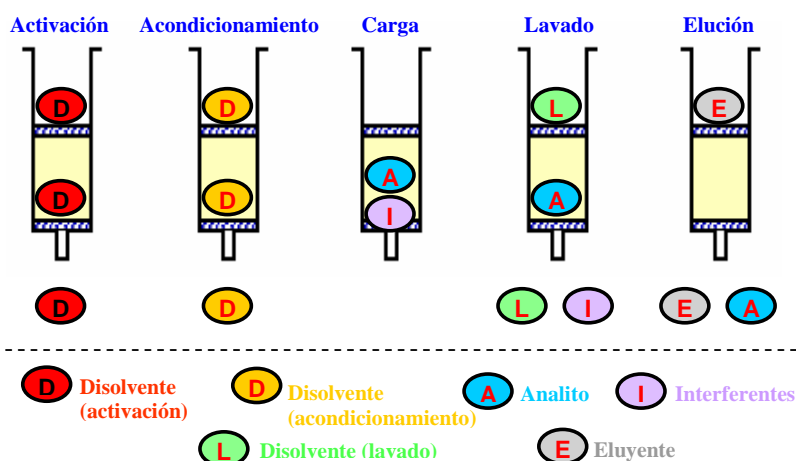


Figura 1.22 - Esquema del procedimiento SPE para la purificación y/o preconcentración de una muestra.

La naturaleza química de los materiales empleados en SPE es similar a la de los utilizados en cromatografía líquida. Es por ello que el proceso de extracción en fase sólida se puede considerar como una cromatografía de baja resolución llevada a cabo en dos situaciones extremas: retención máxima de los analitos durante el paso de la muestra y retención mínima durante la elución.

³⁰⁹ Hagen D., Markell C., Schmitt G., Blevins D., *Membrane approach to solid-phase extractions*. Anal. Chim. Acta 236; 157-164, 1990.

El formato más común de los dispositivos comercializados para aplicar esta técnica se introdujo a finales de los años 70, y consiste en columnas fabricadas principalmente en polipropileno. El adsorbente se mantiene fijo gracias a dos fritados que normalmente son partículas de polipropileno sinterizadas. El tamaño de las partículas (40-60 μm de diámetro) es tal que permite el paso de líquidos con una ligera succión. Este formato presenta sin embargo ciertos problemas si el volumen de muestra es elevado o si contiene partículas en suspensión. Para solventar estos inconvenientes, a principios de los años 90 se introdujo la utilización de discos³¹⁰, de aproximadamente 0.5 mm de grosor y entre 4 y 96 mm de diámetro. La demanda creciente de dispositivos adecuados con objeto de permitir el análisis simultáneo de un elevado número de muestras, originó en 1997, el diseño del formato de 96 pocillos³¹¹. En este dispositivo, cada pocillo contiene un pequeño disco o un minicartucho, con menos de 50 mg de material adsorbente. Por lo tanto, el volumen de eluyente es mínimo, entre 100 y 200 μL de disolvente.

Una posibilidad interesante que ofrece la SPE es la de llevar a cabo el proceso de extracción en línea con el de análisis mediante cromatografía líquida, lo que se consigue utilizando precolumnas. De esta manera no es necesario manipular la muestra para su inyección, lo que reduce las posibilidades de contaminación y pérdidas producidas por las transferencias.

³¹⁰ Markell C., Hagen D.F., Bunnelle V.A., *New technologies in solid-phase extraction*. LC-GC 9; 332-337, 1992

³¹¹ Wells D. A., *96-Well plate products for solid-phase extraction*. LC-GC 17; 600-616, 1999

8.3.2 - Tipos de adsorbentes

La selectividad de la SPE está relacionada con la capacidad del adsorbente de discriminar entre los analitos de interés y los demás compuestos de la matriz. Por lo tanto, las propiedades del adsorbente estarán relacionadas e implicadas con la estructura química del analito y/o la composición de la matriz de la muestra. Así, una sustancia sólida con una fuerte afinidad hacia analitos orgánicos puede retener y concentrar este tipo de compuestos, cuando están presentes en las muestras, existiendo diferentes adsorbentes específicos para la extracción de diferentes grupos de compuestos orgánicos con varios grados de selectividad. Este factor ha de ser optimizado mediante la elección de la fase estacionaria más adecuada.

Los materiales utilizados en SPE tienen en común una estructura tridimensional rígida y porosa, con una elevada área superficial. Los más comúnmente utilizados son sílice o resinas poliméricas, los cuales pueden modificarse mediante la introducción de diferentes grupos funcionales.

Los adsorbentes con base silíceo consisten en un gel de sílice, el cual puede modificarse mediante la unión covalente a los grupos silanol de diferentes grupos funcionales, bien de naturaleza polar, apolar, iónica o mixta (apolar + iónica). Dependiendo por tanto de la funcionalidad del adsorbente, los mecanismos de retención son distintos. Es frecuente el uso de fases que contienen C_{18} , es decir, con una cadena alquílica compuesta por 18 carbonos (-octadecilo) unida covalentemente a los grupos silanoles, donde su mecanismo de interacción se basa en establecer uniones de naturaleza apolar con los analitos de interés.

También se pueden encontrar algunos estudios que utilizan otras fases como C₈, con cadena alquílica compuesta por 8 carbonos (-octilo); C₂, con cadena alquílica compuesta por 2 carbonos (-etilo); SAX (intercambiadora aniónica - sal de amonio cuaternaria covalentemente ligada a la superficie de la partícula de sílice); etc. Sin embargo, las fases estacionarias conteniendo sustancias hidrófobas como C₁₈ y C₈ presentan ciertos inconvenientes como puede ser la coextracción de sustancias aromáticas como los ácidos húmicos en muestras de aguas superficiales.

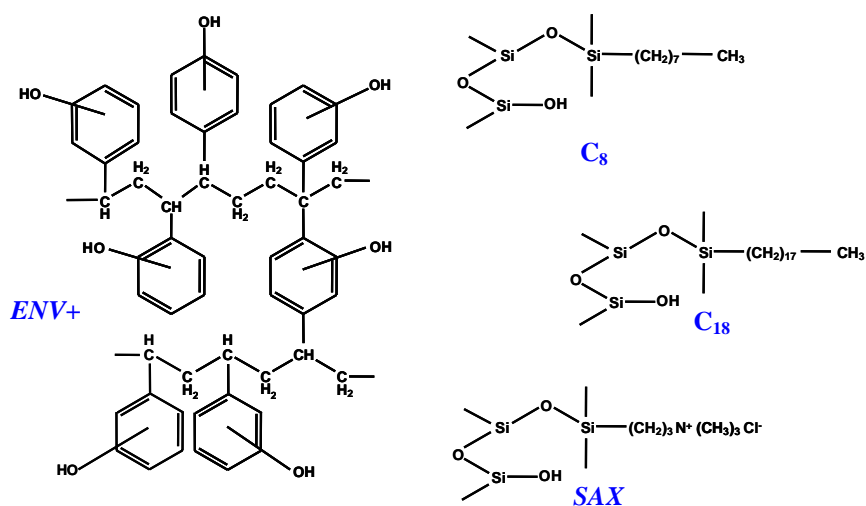


Figura 1.23 - Distintos tipos de adsorbentes usados en SPE

En la **Tabla 1.11** se muestra un resumen de las aplicaciones descritas en la literatura del uso de adsorbentes de sílice para la purificación y preconcentración de SPC, AP, APEO y AEO en muestras medioambientales.

Tabla 1.11 - Aplicaciones de adsorbentes con base de sílice de SPE para la purificación de AP, APEO, SPC y AEO en matrices medioambientales.

Analitos	Matriz	SPE	Técnica	Ref.
NP ₁₋₂₀ EO, NPECs, LAS, SPC	Aguas de depuradora	C ₁₈	LC-FD, LC-UV	312
C ₁₂₋₁₅ EO	Agua de río Agua de depuradora	C ₁ + SAX + SCX	GC-MS	313
1C ₁₂ LAS, SPC (C ₂ , 3C ₃ , 4C ₄ , 5C ₅ , 6C ₆ , 7C ₇), metabolitos sin sulfonar	Aguas naturales	C ₁₈	LC-UV	314
SPC (C ₇ -C ₁₃)	Agua de marisma	C ₁₈ + SAX	LC-FD (LAS) LC-UV (LAS + SPC) LC-MS (SPC)	315
C ₁₂₋₁₅ EO ₂₋₁₈	Agua depuradora	C ₁ + SAX + SCX	LC-MS	316
NP ₁₋₁₀ EO OP ₁₋₁₀ EO	Sedimentos	C ₁₈	LC-FD, GC-MS	210
NP ₁₋₁₉ EO NP	Sedimentos marinos	Cianopro- pil sílica	LC-MS	214

³¹² Marcomini A., Di Corcia A., Samperi R., Capri S., *Reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of linear alkylbenzene sulphonates, nonylphenol polyethoxylates and their carboxylic biotransformation products*. J. Chrom. A 644; 59-71, 1993.

³¹³ Fendinger N.J., Begley W.M., McAvoy D.C., Eckhoff W.S., *Measurement of Alkyl Ethoxylate Surfactants in Natural Waters*. Environ. Sci. Technol., 29; 856-863, 1996.

³¹⁴ Sarrazin L., Arnoux A., Rebouillon P., *High-performance liquid chromatographic analysis of a linear alkylbenzenesulfonate and its environmental biodegradation metabolites*. J. Chrom. A 760; 285-291, 1997.

³¹⁵ González-Mazo E., Honing M., Barceló D., Gómez-Parra A., *Monitoring long-chain intermediate products from the degradation of linear alkylbenzene sulfonates in the marine environment by solid-phase extraction followed by liquid chromatography/ion spray mass spectrometry*. Environ. Sci. Technol. 31; 504-510, 1997.

³¹⁶ Evans K.A., Dubey S.T., Kravetzl L., Evvets S.W., Dzidic I., Dooyema C.C., *Quantitation of alcohol ethoxylate surfactants in environmental samples by electrospray mass spectrometry*. J. Am. Oil Chem. Soc., 74; 765-773, 1997.

Tabla 1.11 - Aplicaciones de adsorbentes con base de sílice de SPE para la purificación de AP, APEO, SPC y AEO en matrices medioambientales. (cont.)

Analitos	Matriz	SPE	Técnica	Ref.
NP, OP, NPEO, NPECs, AEO (C ₁₀ -C ₁₈), Phtalatos, BFA	Fangos depuradora	C ₁₈	LC-MS	219
NP, OP, derivados halogenados y carboxilados, NP ₁₋₃ EO, OP ₁₋₃ EO	Sedimentos	C ₁₈	LC-MS	220
LAS (C ₁₀ -C ₁₃) SPC (C ₄ -C ₁₃)	Agua de mar Sedimentos Aguas intersticiales	C ₁₈	LC-FD	218
LAS (C ₁₀ -C ₁₃) SPC (C ₆ -C ₁₂)	Agua de lago	C ₁₈	LC-MS	317
C ₁₂₋₁₆ EO ₀₋₁₈ C ₁₈ EO ₀₋₁₈	Agua Agua residual	C ₂ +SAX+S CX	LC-MS	318
NP _n EO, OP _n EO (n=9) BrNP, XN ₁₋₂ PEC, XNP ₁₋₂ EO,	Fangos Sedimentos	C ₁₈	LC-MS	224
NP, OP, NP ₁₋₉ EO, OP ₁₋₁₅ EO	Aguas de depuradora	C ₁₈	LC-FD	319
LAS (C ₁₀ -C ₁₃) SPC totales	Aguas residuales Aguar de río	C ₁₈	LC-UV	228

³¹⁷ Eichhorn P., Flavier M.E., Paje M.L., Knepper T.P., *Occurrence and fate of linear and branched alkylbenzenesulfonates and their metabolites in surface waters in the Philippines*. Sci. Total Environ. 269; 75-85, 2001.

³¹⁸ Dunphy J.C., Pessler D.G., Morral S.W., Evans K.A., Robaugh D.A., Fujimoto G., Negahban A., *Derivatization LC/MS for the simultaneous determination of Fatty Alcohol and Alcohol Ethoxylate surfactants in water and wastewater samples*. Environ. Sci. Technol. 35; 1223-1230, 2001.

³¹⁹ Takasu T., Iles A., Hasebe K., *Determination of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates by reversed-phase high-performance liquid chromatography and solid-phase extraction*. Anal. Bioanal. Chem. 372; 554-561, 2002.

Tabla 1.11 - Aplicaciones de adsorbentes con base de sílice de SPE para la purificación de AP, APEO, SPC y AEO en matrices medioambientales. (cont.)

Analitos	Matriz	SPE	Técnica	Ref.
LAS (C ₁₀ -C ₁₄) SPC (C ₃ -C ₆ , C ₈ -C ₁₃)	Aguas de estuario Agua de mar	C ₁₈ + SAX	LC-FD	229
NP, NP ₁₋₃ EO, CINP, BrNP, XNP ₁ EO (X=Cl, Br), CINP ₁ EC	Agua de río	C ₁₈	GC-MS/MS	320
C ₁₂₋₁₆ EO ₀₋₂₀ C ₁₈ EO ₀₋₂₀	Agua de depuradora	C ₈	LC-MS	321
4-NP, 4-t-OP, NP ₁₋₂ EO, BPA, AEO	Agua de río	C ₁₈	LC-MS	322
LAS, AESs, APEO, AEO, SPC (2C ₂ - 13C ₁₃), AP, APECs	Sedimentos	C ₁₈	LC-MS	240
C ₁₂₋₁₇ EO ₀₋₂₃ C ₁₈ EO ₀₋₂₃	Sedimentos	C ₂ +SAX+S CX	LC-MS	242
4-n-NP NP ₁₋₂ EO, BPA, TCS	Fangos	C ₁₈	GC-MS	244
OP, NP, NP ₁₋₁₅ EO, OP ₁₋₁₅ EO, C _n EO ₆ (n= 8, 10, 12, 14, 16)	Suelos tratados con fangos	C ₁₈	LC-MS	246

³²⁰ Hoai P.M., Tsunoi S., Ike M., Kuratani Y., Kudou K., Viet P.H., Fujita M., Tanaka M., *Simultaneous determination of degradation products of nonylphenol polyethoxylates and their halogenated derivatives by solid-phase extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry after trimethylsilylation*. J. Chrom. A, 1020; 161-171, 2003.

³²¹ Sparham C.J., Bromilow I.D., Dean J.R., *SPE/LC/ESI/MS with phthalic anhydride derivatisation for the determination of alcohol ethoxylate surfactants in sewage influent and effluent samples*. J. Chrom. A, 1062; 39-47, 2005.

³²² Céspedes R., Lacorte S., Ginebreda A., Barceló D., *Chemical monitoring and occurrence of alkylphenols, alkylphenol ethoxylates, alcohol ethoxylates, phthalates and benzothiazoles in sewage treatment plants and receiving waters along the Ter River basin (Catalonia, N.E. Spain)*. Anal. Bioanal. Chem. 385; 992-1000, 2006.

Tabla 1.11 - Aplicaciones de adsorbentes con base de sílice de SPE para la purificación de AP, APEO, SPC y AEO en matrices medioambientales. (cont.)

Analitos	Matriz	SPE	Técnica	Ref.
4-NP, 4-t-OP NP ₁₋₁₅ EO	Materia particulada Fangos	C ₁₈	LC-MS	233

La introducción de adsorbentes poliméricos permitió ampliar el intervalo de pH de trabajo. El polímero introducido por primera vez en el campo del tratamiento de muestra consistió en el poliestireno divinilbenceno (*PS-DVB*) altamente entrecruzado. La elevada hidrofobicidad de este copolímero hacía imprescindible una etapa de acondicionado y un control riguroso para evitar su secado. Posteriormente, la introducción de grupos polares (hidroxilo, acetilo, etc.) permitió aumentar el carácter hidrofílico del polímero. Por otro lado, la utilización de copolímeros de divinilbenceno y N-vinilpirrolidona ha permitido en algunos casos eliminar la etapa de acondicionamiento³²³.

Los adsorbentes poliméricos también han sido empleados para el análisis mediambiental y/o de patrones de SPC, APEO y AEO siendo los de carbono grafitizado (GCB) unos de los más empleados. Además de estos se han usado otros como los adsorbentes de copolímeros de estireno divinilbenzeno hidroxilado (ENV+), o los RDX, Sep-Pak plus PS-2 y HLB. En la **Tabla 1.13** se recogen algunas aplicaciones descritas en la literatura del uso de adsorbentes poliméricos para la purificación y preconcentración de SPC, AP, APEO y AEO en muestras medioambientales.

³²³ Bouvier E.S.P., Martin D.M., Iraneta P.C., Capparella M., Cheng Y.-F., Phillips D.J., *A novel polymeric reversed phase sorbent for solid-phase extraction*. LC-GC. 15; 152-162, 1997

Tabla 1.12 – Aplicaciones de adsorbentes poliméricos para la purificación de AP, APEO, SPC y AEO en matrices medioambientales.

Analitos	Matriz	SPE	Técnica	Ref.
LAS (C ₁₀ -C ₁₃) SPC (2C ₄)	Aguas residuales Agua de río	GBC	GC-MS	324
NP, NPE ₁₋₃ O, NPE ₁₋₃ C, CNPEC	Agua de río y efluentes residuales	GBC	GC-MS	325
LAS (2C ₁₂) SPC (3C ₄)	Pescado Agua	GBC	LC-FD	326
NP, NPEO total, LAS total SPC total	Agua de río	GBC	GC-MS	327
LAS (C ₁₀ -C ₁₃) SPC (C ₂ -C ₁₃)	Aguas residuales	ENV+	CE-MS	328
LAS (C ₁₀ -C ₁₃) SPC (C ₂ -C ₅ , C ₈ , C ₁₀ , C ₁₁)	Aguas residuales Fangos	ENV+	LC-MS	223
C _{10, 14, 16, 18} EO ₆ C ₁₂ EO ₃₋₉	Aguas superficiales	RDX	LC-MS	329

- ³²⁴ Ding W.H., Lo J.H., Tzing S.H., *Determination of Linear Alkylbenzenesulfonates and their degradation products in water samples by Gas Chromatography with ion-trap Mass Spectrometry*. J. Chrom. A 818; 270-279, 1998.
- ³²⁵ Ding W.H., Tzing S.H., *Analysis of Nonylphenol Polyethoxylates and their degradation products in river water and sewage effluent by Gas Chromatography-Ion Trap (tandem) Mass Spectrometry with Electron Impact and Chemical Ionization*. J. Chrom. A 824; 79-90, 1998.
- ³²⁶ Tolls J., Haller M., Sijm D., *Extraction and isolation of linear alkylbenzenesulfonate and its sulfophenylcarboxylic acid metabolites from fish samples*. Anal. Chem. 71; 5242-5247, 1999.
- ³²⁷ Ding W.H., Tzing S.H., Lo J.H., *Occurrence and concentrations of aromatic surfactants and their degradation products in river waters of Taiwan*. Chemosphere 38; 2597-2606, 1999.
- ³²⁸ Riu J., Barceló D., *Determination of Linear Alkylbenzene Sulfonates and their polar carboxylic degradation products in sewage treatment plants by automated Solid-Phase Extraction followed by Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry*. The Analyst 126; 825-828, 2001.
- ³²⁹ Krogh K.A., Vejrup K.V., Mogensen B.B., Sorensen B.H., *Liquid Chromatography–Mass Spectrometry method to determine Alcohol Ethoxylates and Alkylamine Ethoxylates in soil interstitial water, ground water and surface water samples*. J. Chrom. A 957; 45-57, 2002.

Tabla 1.12 - Aplicaciones de adsorbentes poliméricos para la purificación de AP, APEO, SPC y AEO en matrices medioambientales. (cont.)

Analitos	Matriz	SPE	Técnica	Ref.
OP, NP, OP ₁₋₅ EO, NP ₁₋₅ EO	Sedimentos	ENV+	LC-MS/MS	234
C ₁₀ E ₆ , C ₁₂ E ₄₋₈ , C ₁₄ E ₆ , C ₁₆ E ₆ , alquilaminas etoxiladas (ANEQ)	Suelos agrícolas	RDX	LC-MS	235
NPEO	Aguas depuradora	GBC		330
NPEO	Aguas depuradora	HLB	LC-MS/MS	331
NP, NP ₁₋₁₅ EO NP ₁₋₁₀ EC	Aguas residuales	Sep-Pak Plus Ps-2 GBC	LC-FD LC-MS/MS	332
4-t-OP, 4-n-NP BPA NP ₁₋₃ EO, NP ₁₋₃ EC OP ₁₋₂ EO	Aguas residuales	HLB	LC-MS/MS	333
NP OP NP ₁ EC NP ₁₋₁₆ EO OP ₁₋₅ EO	Materia en suspensión Sedimentos	ENV+	LC-MS/MS	243

³³⁰ Esperanza M., Suidán M.T., Nishimura F., Wang Z.M., Sorial G.A., Zaffiro A., McCauley P., Brenner R., Sayles G., *Determination of sex hormones and Nonylphenol Ethoxylates in the aqueous matrixes of two pilot-scale municipal wastewater treatment plants*. Environ. Sci. Technol. 38; 3028-3035, 2004.

³³¹ Jahnke A., Gandrass J., Ruck W., *Simultaneous determination of Alkylphenol Ethoxylates and their biotransformation products by Liquid Chromatography/Electrospray Ionisation tandem Mass Spectrometry*. J. Chrom. A 1035; 115-122, 2004.

³³² Komori K., Okayasu Y., Yasojima M., Suzuki Y., Tanaka H., *Occurrence of Nonylphenol, Nonylphenol Ethoxylate surfactants and Nonylphenol Carboxylic Acids in wastewater in Japan*. Water Science & Technology 53; 27-33, 2006.

³³³ Loos R., Hanke G., Umlauf G., Eisenreich S.J., *LC-MS-MS analysis and occurrence of octyl- and nonylphenol, their ethoxylates and their carboxylates in Belgian and Italian textile industry, waste water treatment plant effluents and surface waters*. Chemosphere 66; 690-699, 2007.

Recientemente, también se ha recurrido al uso de nuevos adsorbentes compuestos por agregados supramoleculares. Estos están formados por tensioactivos iónicos adsorbidos en la superficie de óxidos de metal tales como la alúmina, la sílice, el bióxido de titanio y el oxihidróxido férrico, denominándose hemimicelas y admicelas, que presentan un alto potencial para ser utilizados como materias de adsorbentes en SPE³³⁴. Las hemimicelas están constituidas por monocapas de tensioactivos adsorbidos en la superficie del óxido que se encuentran con cargas opuestas, mientras que las admicelas tienen una estructura de doble capa con la superficie exterior compuesta por el grupo iónico de la cabeza del tensioactivo y la parte interior con la cadena hidrocarbónica (**Figura 1.13**). Así, por este mecanismo, las hemimicelas serían responsables por interacciones relacionadas entre las cadenas alquílicas y las admicelas entre los grupos polares. Estos nuevos tipos de adsorbentes presentan como ventajas una alta eficiencia de extracción, fácil elución de los analitos, permiten un alto flujo en la etapa de carga y un mayor volumen de ruptura. Según nuestro conocimiento, este tipo de adsorbentes no han sido usados hasta la actualidad para el análisis de los analitos objeto de estudio de esta Memoria.

También existen los denominados adsorbentes de acceso restringido, que permiten únicamente el paso de moléculas pequeñas. Además, en los últimos años se han introducido en el mercado otro tipo de adsorbentes que permiten una elevada selectividad en la extracción. Estos materiales, basados en el reconocimiento molecular, consisten en anticuerpos inmovilizados y en polímeros de huella molecular.

³³⁴ Rubio S., Pérez-Bendito D., *Supramolecular assemblies for extracting organic compounds*. Trends Anal. Chem. 22; 470-485, 2003.

9.- LA VEGA DE GRANADA

A continuación se comentan las principales características de la región de donde se ha llevado a cabo los estudios de campo.

9.1 Antecedentes históricos

Hace miles de años, la Vega de Granada, era una densa zona boscosa, donde se practicaba la caza, y con extensas zonas de marjales inundadas. La mayor transformación física se debió a la aparición de la agricultura y la ganadería.

Durante la época musulmana se diseñó probablemente el actual sistema de regadío por acequias, que riegan casi toda la Vega de Granada y que derivan de los principales cursos de agua superficial. Existen pocos datos de la utilización del agua en civilizaciones anteriores, aunque se conservan restos de obras hidráulicas de la época romana e incluso de la época íbera.

Hasta la segunda mitad del siglo XX, no se produjeron cambios significativos en la explotación del acuífero. Estos cambios supusieron la creación de pozos de gran diámetro a lo largo del cauce del río Genil, aunque la explotación del acuífero seguía siendo mínima. En años posteriores se siguieron construyendo pozos en la parte baja de la Vega, conservándose en la actualidad más de un millar de este tipo de sondeos.

A partir de los años 60, la agricultura de la Vega de Granada sufre un nuevo empuje, que se ve reflejado en la realización de grandes sondeos, y además se profundizan algunos de los ya existentes. Es en el último

cuarto de siglo cuando se construyen los embalses de Quéntar (1973) y Canales (1988), que recogen una parte importante de las aguas de deshielo.

9.2 Características físicas y socioeconómicas de la Vega de Granada

El área de la Vega de Granada corresponde a una vasta llanura de aluvión que se extiende a ambos márgenes del río Genil, entre las poblaciones de Cenes de la Vega, al Este, y de Láchar al Oeste.

Los materiales que la forman son los depósitos aluviales del río Genil y de sus afluentes de cabecera, los ríos Dilar, Monachil, Darro, Cubillas y Velillos. Sus dimensiones son de 22 Km de longitud (en sentido Este-Oeste) por unos 8 Km de anchura, con espesores superiores a 250 metros en el sector central³³⁵.

El acuífero detrítico de la Vega de Granada cuenta con unos recursos hídricos de $18000 \text{ hm}^3 \cdot \text{ha}^{-1}$ y unas reservas explotables de 1000 hm^3 . La explotación neta todavía no alcanza el 50% de los recursos renovables y el excedente escapa del sistema a través de emergencias. La pluviometría y temperatura medias anuales del área son de 450 mm y 15 °C, respectivamente³³⁶.

En la actualidad, en ella, una treintena de poblaciones, incluida Granada capital, se concentra una población estable de 500000 habitantes.

³³⁵ Castillo A., *Estudio hidroquímico del acuífero de la Vega de Granada*. Memoria de Tesis Doctoral. Univ. Granada, Granada, España, p. 658, 1986.

³³⁶ Castillo A., *El embalse subterráneo de la Vega de Granada, uno de los más importantes de Andalucía*. Tierra y Tecnología 9; 37-42, 1995.

Alrededor de 40000 personas dependen exclusivamente del abastecimiento de aguas subterráneas, y existe una intensa explotación agrícola que abarca una superficie de regadío de más de 15000 ha. Los cultivos más extendidos corresponden a cereal, choperas, hortalizas, maíz y tabaco. Esta zona corresponde al 95 % de la superficie del acuífero, y en ella el espesor no saturado es inferior a 25 m en más de la mitad de su extensión.

9.3 Calidad de las aguas subterráneas en la Vega de Granada

Las aguas del acuífero proceden en más de un 70 % de la infiltración de escorrentías del deshielo de Sierra Nevada, hecho que condiciona que los sectores de mejor calidad se localicen en la cabecera del acuífero (área Sur-oriental) y bajo la cabecera del río Genil.

Existen focos puntuales de enriquecimientos salinos y de contaminación por nitratos, esta última debida al empleo de fertilizantes agrícolas. Las aguas más salinas se localizan en los sectores de Sierra Elvira-Alitaje, aeropuerto Romilla-Láchar y Maracena-Pulianas.

En cuanto a la contaminación de esta zona, la que más se destaca se debe a la presencia de plaguicidas. En estudios realizados en la década de los 80, ya se mencionaban contaminaciones por plaguicidas organoclorados (OCIs)³³⁷. Agustín³³⁸ en 1983 detectó importantes contaminaciones por

³³⁷ Acuña M.J., *Contaminación por plaguicidas organoclorados en la Vega de Granada*. Memoria de Tesis Doctoral. Univ. Granada, Granada, España, p. 380, 1981.

³³⁸ Agustín C., *Contaminación por plaguicidas en aguas superficiales y suelos de cultivo de la provincia de Granada*. Memoria de Tesis Doctoral. Univ. Granada, Granada, España, p. 378, 1983.

plaguicidas OCl_s en las aguas superficiales y suelos de cultivo de la provincia de Granada. Los plaguicidas OCl_s presentan una elevada persistencia y hoy en día su uso se halla muy restringido o, incluso, prohibido.

En un estudio realizado en aguas de la zona saturada del acuífero³³⁹ entre los años 1993 y 1994, sólo se encontraron 10 contaminaciones cercanas o superiores al nivel establecido por la Unión Europea³⁴⁰ ($0.1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), siendo la contaminación más importante por su extensión, la debida al captano. Este plaguicida es un fungicida relativamente polar, de baja solubilidad en agua y se encontró después de una época de lluvias, por lo que probablemente se empleó para prevenir posibles ataques favorecidos por la humedad. También se detectaron contaminaciones puntuales y esporádicas por el herbicida triazínico triazina, durante los meses de verano. Por tanto, la ausencia de contaminaciones por plaguicidas en los trabajos realizados recientemente hace resaltar el poder de depuración de la franja no saturada.

Sin embargo hay que tener en cuenta que la contaminación del acuífero depende de factores externos, no controlables, como el aporte hídrico que recibe el acuífero y de la cantidad de riego que se aplique en las prácticas agrícolas. El riesgo de contaminación puede ser mayor en estos casos, por lo que los estudios de prevención son importantes para conservar la calidad de las aguas de este acuífero del que, como ya se ha mencionado, se abastece un número importante de habitantes. A

³³⁹ de la Colina C., *Metodología para la determinación de residuos de plaguicidas en aguas. Aplicación al acuífero de la Vega de Granada*. Memoria de Tesis Doctoral. Univ. Granada, Granada, España, p. 303, 1996.

³⁴⁰ Steenhuis T.S., Staubitz W., Andreini M.S., Surface J., Richard T.L., Paulsen R., Pickering N.B., Hagerman J.R., Geohring L.D., *Preferencial movement of pesticides and traces in agricultural soils*. J. Irrig. Drain. Eng. 116; 50-66, 1990.

continuación, en el siguiente esquema, se indican los factores que pueden alterar el transporte de contaminantes en el suelo, según Flury³⁴¹:

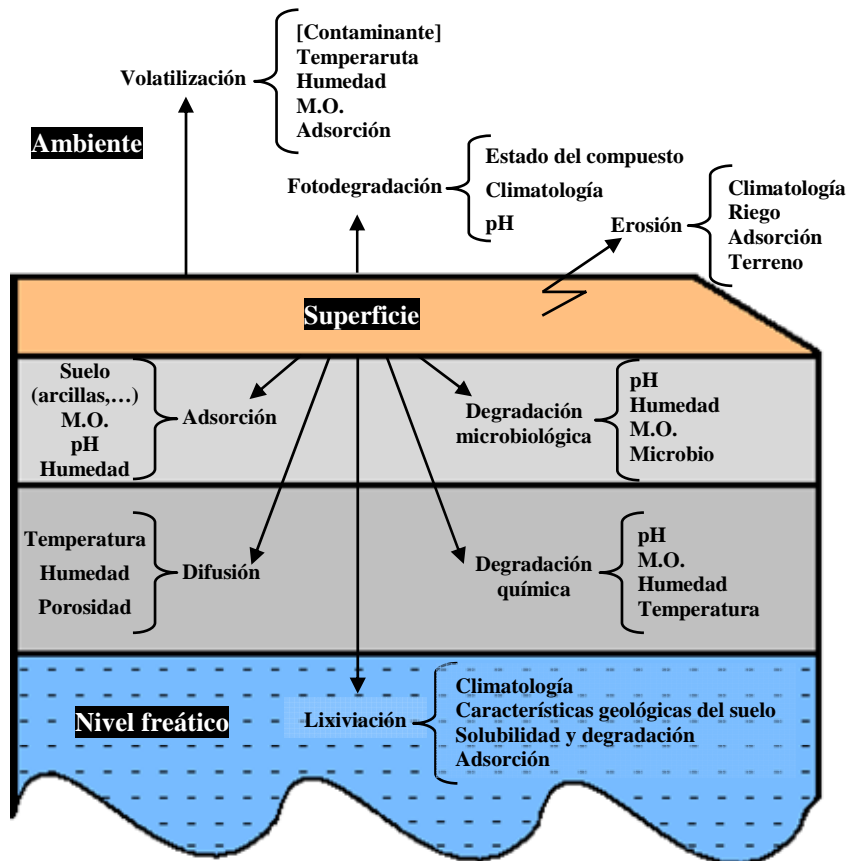


Figura 1.24 - Procesos que afectan al transporte de contaminantes en el suelo

El estudio desarrollado en esta Memoria también presenta como finalidad la verificación del comportamiento de un suelo proveniente de esta zona (Vega de Granada) cuando es expuesto a una determinada cantidad de los tensioactivos alquilfenoles etoxilados. Así mismo se

³⁴¹ Flury M., *Experimental evidence of transport of pesticides through field soils. A review.* J. Environ. Qual. 25; 25-45, 1996.

presenta el estudio de biodegradación del tensioactivo LAS en un suelo expuesto al mismo mediante el análisis de sus productos de degradación (SPC) en las aguas de riego de este suelo.

CAPÍTULO 2

EXPERIMENTAL: MATERIALES Y MÉTODOS

1.- INTRODUCCIÓN

En el presente capítulo se describen las disoluciones, reactivos, material de laboratorio y la instrumentación que han sido necesarios para el desarrollo de la experimentación de esta Memoria de Doctorado. También se recogen los tratamientos estadísticos empleados para la calibración y validación de los métodos analíticos optimizados.

2.- DISOLUCIONES, REACTIVOS Y DISOLVENTES

2.1 - Disoluciones

Se recogen en este apartado todas las disoluciones utilizadas a lo largo del trabajo experimental.

⇒ **Disoluciones patrón.** Preparadas por pesada exacta de las cantidades de sustancia patrón correspondiente mostradas en la **Tabla 2.1.** y posterior disolución en agua, en el caso de los ácidos sulfonilcarboxílicos y ácido p-sulfobenzoico (patrón interno); en metanol, en el caso de los sulfonatos de alquilbenceno lineal, alquilfenoles, alquilfenoles etoxilados y alcoholes etoxilados; y en acetato de etilo, en el caso del antraceno y acenafteno, ambos usados como patrones internos.

Las disoluciones se conservaron en frigorífico, en botes de cristal ámbar para evitar la acción de la luz y a una temperatura de 4 °C. Para comprobar la estabilidad de las disoluciones, se hizo un seguimiento periódico del valor de la señal analítica correspondiente y se comprobó que no existían diferencias superiores al 5 % en la señal obtenida para las distintas disoluciones, durante un periodo de al menos seis meses.

Tabla 2.1 - Sustancias patrón.

Patrón	Pureza	Fabricante	C (mg·L ⁻¹)
LAS	44.05 %	PETRESA, S.A.	1000
C ₂ -SPC	---	Sintetizado	100
2C ₃ -SPC	---	Sintetizado	100
2C ₄ -SPC	---	Sintetizado	100
3C ₄ -SPC	---	Sintetizado	100
4C ₄ -SPC	---	Sintetizado	100
5C ₅ -SPC	---	Sintetizado	100
Ác. <i>p</i> -sulfobenzoico	≥ 98.0 %	Sigma-Aldrich	100
4- <i>t</i> -OP	≥ 90.0 %	Fluka	1000
4- <i>n</i> -OP	≥ 99.0 %	Dr. Ehrenstorfer	1000
4- <i>n</i> -NP	≥ 98.0 %	Alfa Aesar	1000
Igepal CA-210	≥ 98.0 %	Sigma-Aldrich	2000
Igepal CA-520	≥ 98.0 %	Sigma-Aldrich	4000
Acnafteno	≥ 99.0 %	Sigma-Aldrich	1000
C ₁₂ E ₆ -AEO	≥ 98.0 %	Fluka	1000
C ₁₂ E ₈ -AEO	≥ 98.0 %	Fluka	1000
C ₁₄ E ₆ -AEO	≥ 99.0 %	Fluka	1000
C ₁₄ E ₈ -AEO	≥ 99.0 %	Fluka	1000
C ₁₆ E ₆ -AEO	≥ 99.0 %	Fluka	1000
C ₁₆ E ₈ -AEO	≥ 98.0 %	Fluka	1000
C ₁₈ E ₆ -AEO	≥ 99.0 %	Fluka	1000
C ₁₈ E ₈ -AEO	≥ 98.0 %	Fluka	1000
Brij 56	≥ 95.0 %	Fluka	10000
Brij 76	≥ 95.0 %	Fluka	10000
Alfonic 1412-9	≥ 98.0 %	Sasol	4000
Antraceno	≥ 99.0 %	Sigma-Aldrich	1000

⇒ **Disoluciones reguladoras.** Las disoluciones reguladoras que se han empleado a lo largo de todo el trabajo experimental son:

- **Ácido fórmico/formiato amónico:** Para prepararlo se empleó:
 - *Ácido fórmico* PA, 98% (Panreac, Barcelona, España)
 - *Amoniaco* PA, 28-30% (Panreac)

- **Ácido acético/acetato amónico:** Para prepararlo se empleó:
 - *Ácido acético* PA (Panreac)
 - *Acetato amónico* PA (Panreac)

- **Ácido fosfórico/fosfato sódico:** Para prepararlo se empleó:
 - *Ácido fosfórico* PA (Panreac)
 - *Dihidrógenofosfato sódico* PA (Panreac)
 - *Monohidrógenofosfato sódico* PA (Panreac)

- **Ácido cítrico/citrato sódico:** Para prepararlo se empleó:
 - *Ácido cítrico* PA (Panreac)
 - *Citrato sódico* PA (Panreac)

2.2 - Reactivos

- **Bromuro de cetiltrimetilamonio [CTAB]** (Fluka, Buchs, Suiza).

-
- **N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) con 1 % de hexametildisilizano y piridina [TMCS]** (Sigma-Aldrich, Madrid, España).
 - **Formaldehído PA**, 37-38% (Panreac). Este reactivo se utilizó para inactivar la acción bacteriana cuando se procesaban las muestras medioambientales.
 - **Hidróxido sódico PA** (Panreac). Se usó para el acondicionamiento del capilar.
 - **Ácido acético glacial PRS** (Panreac).
 - **Ácido fórmico PA** (Panreac).
 - **Ácido clorhídrico PA**, 37% (Panreac).
 - **Ácido trifluoroacético PRS** (Fluka).
 - **Ácido perclórico PRS** (Panreac).
 - **Ácido fosfórico PA**, 85 % (Panreac).
 - **Amoniaco PRS**, 30 % (Panreac).

2.3 - Gases empleados

- **Helio** calidad ALFAGaz 99.999% de pureza (Air Liquid)
- **Nitrógeno** calidad ALFAGaz 99.999% de pureza (Air Liquid).

2.4 - Disolventes

- **Acetona** grado HPLC (Merck, Darmstadt, Alemania).
- **Metanol** grado HPLC (Merck).
- **Metanol** PRS (Panreac).
- **Acetonitrilo** grado HPLC (Panreac).
- **2-propanol** grado HPLC (J. T. Baker, Deventer, Holanda).
- **Etilenglicol** PRS (Panreac).
- **Tetrahidrofurano** grado HPLC (Sigma-Aldrich).
- **n-Hexano** grado HPLC (Merck).
- **Diclorometano** PRS (Panreac).
- **Éter dietílico** PA (J. T. Baker)

- **Acetato de etilo** PRS (Riedel-de-Haën, Madrid, España).

3.- MATERIAL DE LABORATORIO E INSTRUMENTACIÓN

3.1 - Material de laboratorio

Para el desarrollo de todo el trabajo experimental, se utilizó el siguiente material:

- **Matraces aforados** clase A, de diferentes capacidades.
- **Pipetas graduadas** y aforadas clase A de diferentes capacidades.
- **Viales de vidrio** para inyección cromatográfica de 2.0 y 1.5 mL de capacidad.
- **Tapones de rosca y de cápsula** para viales de inyección cromatográfica.
- **Viales de vidrio de 7 mL** con tapón de rosca y septum de silicona para las reacciones de derivatización.
- **Tubos de centrifuga** de 100 mL de capacidad.
- **Microinsertos de cristal** de 0.20 y 0.25 mL de capacidad para vial cromatográfico.

- **Encapsulador** para viales cromatográficos.
- **Descapsulador** para viales cromatográficos.
- **Micropipetas** de 0.5-10 μL , 10-50 μL , 50-200 μL , 200-1000 μL y 1000-10000 μL .
- **Frascos de plástico** (polipropileno), con capacidad volumétrica de 80 mL.
- **Matraces kitasatos** para vacío de diferentes tamaños
- **Membranas de filtración 0.45 μm de nylon Millipore**, empleadas para la filtración de disolventes orgánicos y/o disoluciones reguladoras del pH.
- **Equipo de filtración Millipore** provisto de:
 - Portafiltros analíticos de soporte de vidrio sinterizado.
 - Matraz kitasato para vacío de 500 mL.
- **Jeringas** de 2 y 10 mL.
- **Agujas** de 0.8x40 mm.
- **Filtros de jeringa** de celulosa regenerada de 0.20 μm .

- **Goteros, vasos de precipitado, tubos de ensayo, pesasustancias, pipetas Pasteur**, así como otro tipo de material elemental de vidrio que podemos encontrar en cualquier laboratorio analítico.

La limpieza y mantenimiento de todo material empleado a lo largo del trabajo experimental se realizó con mezcla crómica o HNO_3 al 50 % (v/v) y enjuagando posteriormente con abundante agua desionizada antes de su utilización.

3.2 - Instrumentación

Los instrumentos empleados para la realización de la parte experimental fueron:

3.2.1 - Electroforesis capilar *Hewlett Packard*^{3D}CE, equipado con:

- Inyector automático (inyección hidrodinámica).
- Carrusel de 48 muestras.
- Sistema de refrigeración del capilar.
- Detector de Diodos Array UV-Vis.

3.2.2 - Cromatógrafo de líquidos *Agilent Technologies* Modelo 1100, equipado con:

- Bomba cuaternaria.
- Sistema de desgasificación mediante bomba de vacío.
- Sistema automático de inyección de con volumen variable (de 0.1 a 100 μL).
- Compartimento termostatzado para la columna cromatográfica.
- Detector de Diodos Array UV-Vis.
- Detector de fluorescencia:
 - Lámpara de descarga modulada de Xenón de 20 W en modo normal y de 5 W en modo económico.
 - Célula de flujo de 8 μL .
 - Monocromadores con intervalos de longitudes de onda de:
 - Rendijas:

3.2.3 - Cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas *Agilent Technologies* Modelo 6890 N, equipado con:

- Portal de inyección para columnas capilares con división de muestra.

- Horno cromatográfico con un rango de temperatura 20 - 400 °C.
- Interfase de transferencia directa de muestra al espectrómetro de masas.
- Columna capilar de sílice *Zebtron Phenomenex ZB-5MS* (30 m x 0.25 mm, 0.25 µm de tamaño de partícula).
- Sistema de inyección automático, provisto de:
 - Inyector automático *Agilent Technologies* Modelo 7683.
 - Bandeja portamuestras *Agilent Technologies* Modelo 7683.
 - Jeringa *Hamilton* de 10 µL de capacidad.
- Espectrómetro de masas *Agilent Technologies* Modelo 5973 Network, provisto de:
 - Fuente de ionización por impacto electrónico a 70 eV.
 - Separador de iones tipo cuadrupolo.
 - Bomba de vacío *Edwards High VAcuum Puma*.
 - Medidor de vacío *Agilent Technologies* Modelo 59864B.

3.2.4 - Equipo de extracción mediante líquidos presurizados, *Dionex* Modelo ASE 200 integrado por:

- Células de acero inoxidable para las muestras de 33 mL de capacidad.

- Carrusel para las células.
- Colector de viales.
- Viales colectores de 50 mL de capacidad.
- Horno con un rango de temperaturas entre 40 y 200 °C.

3.2.5 - Equipo para Extracción en Fase Sólida integrado por:

- Sistema de vacío múltiple de 12 canales con barómetro incorporado, modelo Visiprep, *Supelco* (Madrid, España).
- Adaptadores y recipientes de 150 mL de capacidad volumétrica, *Supelco*.
- Cartuchos de extracción en fase sólida C₁₈ (EC) *Isolute* (Mid Glamorgan, UK) de 500 mg y 3 mL de capacidad.
- Cartuchos de extracción en fase sólida ENV+ *Isolute* de 200 mg y 3 mL de capacidad.

3.2.6 - Otros aparatos e instrumentos

- **Balanzas Analíticas** *Mettler* Modelo *PJ360 Delta Range* y *Mettle* Modelo *AE 163*.
- **pH-metro** digital *Crison* (*Crison Instruments*, Barcelona, España) Modelo *Micro-pH 2000*, provisto de electrodo combinado de vidrio y cloruro de plata.
- **Estufa de secado** de 50 - 300 °C, *Heareus*.
- **Baño de ultrasonido** *Selecta* de 1000 mL de capacidad.
- **Centrífuga** *Hettich* (*Tuttlingen*, Alemania) Modelo *Universal 32*.
- **Placa agitadora - calefactora** *Heildoph* Modelo *2002*.
- **Bomba de vacío** *Schott Iberica* Modelo *MZ 2C*, con capacidad de succión de $1.7 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$.
- **Bomba peristáltica** *Ismatec* (Barcelona, España), con capacidad para 4 canales.
- **Arcón congelador y frigorífico** *Comersa*.
- **Termostato** *B. Braun* Modelo *Frigomix U plus Thermomix 1441*.

- **Colector de fracciones** *Amersham Biosciences* Modelo Frac-200, con capacidad para 95 tubos.
- **Agitador de tubos** *IKA* Modelo Yellow line TTS 2.
- **Tamices metálicos** de distinta malla *Mecánica Científica*, con mallas nº 5; nº 14; nº 30 - *ASTM*.

4.- PROGRAMAS INFORMÁTICOS

- *La recogida y tratamiento de los datos de los sistema LC-FD, GC-MS y CE-DAD se ha realizado mediante el programa Chemstation.*

- *Las estructuras químicas se ha dibujado con el programa CS ChemDraw Pro, Cambridge Soft Corporation 1985-1997 (1997).*

- *Los programas de cálculo utilizados han sido:*
 - *Statgraphics Plus 4.1, STSC. Inc., de Statistical Graphics Corporation, USA (1999).*
 - *Microsoft Office Excel 2003 Copyright 1983-2003 Microsoft Corporation (2003).*

5.- CALIBRACIÓN Y PARÁMETROS ANALÍTICOS DEL MÉTODO

Los métodos instrumentales de análisis suelen ser métodos comparativos o relativos. Por tanto, para obtener la concentración de analito presente en una muestra, es necesario realizar la comparación de la medida física o físico-química, con la de un conjunto de patrones de composición conocida a través de lo que llamamos *proceso de calibración química*. Es por ello que la calibración, como etapa integrante del proceso analítico, es de gran importancia y sólo se puede obtener una buena exactitud en los resultados si se aplican buenos métodos de calibración.

El proceso de calibración consta de dos etapas:

⇒ ***Etapa de calibración.*** En ella se establece el modelo que relaciona la variable dependiente (señal analítica) con la variable independiente (concentración).

$$\text{Señal analítica} = f(\text{concentración}) \quad (2.1)$$

⇒ ***Etapa de predicción.*** Consiste en obtener las variables independientes, es decir, las concentraciones, de una o más muestras problema a partir del valor obtenido para la variable dependiente. El valor de la variable independiente correspondiente a muestras patrón, junto con las sensibilidades, permiten predecir los valores de estas variables en las muestras problema.

Dentro del campo de la Química Analítica los modelos de calibración más utilizados son de *regresión univariante*. Estos modelos se caracterizan por

la existencia de una variable independiente (**concentración**) que se relaciona con la respuesta (**señal instrumental**) mediante una relación lineal. La relación funcional que se establece entre ambas variables, se ajusta a un modelo matemático del tipo:

$$Y = a + b \cdot X \quad (2.2)$$

donde **Y** es la variable dependiente, **X** la independiente, y **a** y **b** dos parámetros estimados a partir de los datos experimentales.

De todos los modelos de regresión, el que ajusta los valores experimentales por medio del algoritmo gaussiano de hacer mínimo el cuadrado de los residuales, es el más frecuentemente usado para el establecimiento de la ecuación de la función de calibrado.

La aplicación de este algoritmo implica el cumplimiento de determinadas condiciones que puedan garantizar la validez del modelo de regresión univariante, siendo estas condiciones las siguientes:

- 1) La existencia de la aleatoriedad de las muestras.
- 2) La relación entre la variable independiente y la variable dependiente, concentración y señal analítica, respectivamente, será lineal en todo el rango de aplicabilidad (linealidad).
- 3) Los errores se tienen que producir únicamente en la medida de la señal instrumental. Esto significa que la variable concentración no debe ser aleatoria, es decir que esté medida sin error o su error aleatorio sea

despreciable frente a la respuesta. En la práctica este error se minimiza con el empleo de sustancias patrón.

4) Los errores en la respuesta deben presentar una distribución normal (normalidad), es decir, deben ser independientes entre sí, estar distribuidos por igual y su media debe ser cero, lo que implica que, para cada concentración de analito, la dispersión de las medidas de la señal analítica debe ser la misma e independiente de dicha concentración. De esta forma, se establece una única desviación estándar, $S_{y/x}$ como representativa de la dispersión de la señal analítica para todo el rango dinámico lineal de concentración de analito. A esta condición se le denomina homogeneidad de varianzas u homocedasticidad.

En la **Figura 2.1** se muestra un modelo de regresión lineal univariante.

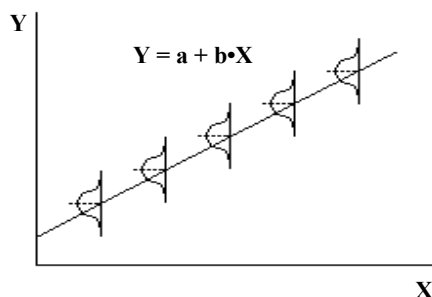


Figura 2.1 - Ilustración gráfica del modelo de regresión lineal.

5.1 - Rechazo de valores anómalos

Tras la obtención de cualquier dato experimental hay que tener en cuenta que antes de considerarlo se debe verificar su idoneidad puesto que puede haber algún valor considerado anómalo. Para esta finalidad se puede recurrir al test estadístico¹ que se emplea para el rechazo de valores anómalos, denominado *Test de la Q de Dixon*. Éste se lleva a cabo de la siguiente manera:

1) Se ordenan los datos a estudiar en orden ascendente para seleccionar el valor discordante y su vecino más cercano.

2) Se calcula la diferencia entre el valor anómalo y el valor más cercano; y la dispersión completa de la serie restando al valor más alto el valor más bajo.

3) A continuación se divide el valor absoluto de la primera diferencia entre la dispersión de la serie para obtener el valor de Q calculado (Q_{cal}). Este valor se compara con un valor de Q tabulado (Q_{tab}) para un nivel de significación del 5 % y para (n-1) grados de libertad, siendo n el número total de valores obtenidos.

Las hipótesis consideradas en este test son:

Valor no anómalo $Q_{cal} < Q_{tab} \Rightarrow$ hipótesis nula (H_0)

Valor anómalo $Q_{cal} \geq Q_{tab} \Rightarrow$ hipótesis alternativa (H_1)

¹ Dean R.B., Dixon W.J., *Simplified statistics for small numbers of observations*. Anal. Chem. 23; 636-638, 1951

5.2 - Función de calibración

El modelo de calibración seleccionado fue el lineal de regresión univariante por mínimos cuadrados. La estimación de los parámetros **a** y **b** del modelo es la primera operación a realizar, con objeto de obtener la función lineal de calibración. Se parte para ello, de una serie de **n** pares de valores experimentales correspondientes a las concentraciones y señales analíticas, y se les aplica el método de mínimos cuadrados.

Si se supone el cumplimiento de la condición de homocedasticidad, el método de mínimos cuadrados proporciona las estimaciones de los parámetros **a** y **b** más precisas entre las veraces. Los intervalos de confianza de la pendiente (**b**) y la ordenada en el origen (**a**) se calculan a partir de las siguientes ecuaciones:

$$\text{Ordenada en el origen } a \pm t_{\alpha, n-2} \cdot S_a$$

$$\text{Pendiente } b \pm t_{\alpha, n-2} \cdot S_b$$

donde $t_{\alpha, n-2}$ es el valor del estadístico **t-Student** para un nivel de significación α determinado y $n-2$ grados de libertad, y S_b y S_a son las desviaciones estándar correspondientes a la pendiente y ordenada en el origen, respectivamente. A lo largo de esta tesis, se utiliza un nivel de significación del 5 %.

La verificación de las hipótesis del modelo en un problema particular es clave para establecer la validez de dicho modelo y, para lograrla, hay que asumir, evidentemente, la aleatoriedad de las muestras, parámetro

controlado por una planificación correcta de la experiencia de calibrado, como también, la normalidad de los datos.

Para comprobar la tendencia lineal de los datos, en esta tesis se ha optado por la evaluación del *fallo de ajuste de los datos homocedásticos al modelo*. El test se aplica sobre el conjunto de parejas de datos experimentales empleadas para establecer el modelo de regresión. Es necesario para ello, tener más de una réplica de algunas de las parejas de datos. Este test compara el valor del estadístico **F**, calculado como el cociente de las varianzas debidas al fallo de ajuste **MS_{FA}** y al error puro **MS_{PE}**, con los valores tabulados para un determinado nivel de significación **α**, fijado en el 5 % y con **k-2** y **n-k** grados de libertad, siendo **k** el número de patrones de calibración diferentes y **n** el número total de observaciones. Esta condición será evaluada mediante el cálculo del valor **P** del test de fallo de ajuste (**P_{lot}**). Si **P** \geq 5 % se concluirá por la existencia de linealidad, es decir, los datos se ajustan al modelo lineal seleccionado.

Finalmente, se estudia la homogeneidad de varianzas, es decir, la condición de homocedasticidad. Para comprobar esta hipótesis, se empleó el *análisis gráfico de los residuos*, según proponen Boqué y Rius², definiendo como residuo la distancia vertical desde cada punto experimental al valor que le correspondería mediante la recta de regresión estimada por mínimos cuadrados. Normalmente se realizan representaciones gráficas de los residuos frente a las respuestas calculadas por el modelo o frente a la variable independiente (concentración). En esta

² Boqué R., Rius F.X., *Avances en Quimiometría Práctica*, Servicio de Publicaciones e Intercambio científico de la Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela, España, 1994

Memoria se ha hecho uso de esta segunda opción, es decir, la representación gráfica de los residuos frente a los valores de concentración.

De la observación de estas gráficas, puede evaluarse el cumplimiento de la condición de homocedasticidad de los datos y detectarse la presencia de valores anómalos, para ello se debe cumplir que sea igual el número de residuos positivos y negativos encontrado, que haya aleatoriedad en la distribución y se obtengan valores similares entre los residuales.

La **Figura 2.2** representa una distribución ideal del tipo de los residuales (que son la diferencia entre los valores predichos y los experimentales) frente a la concentración.

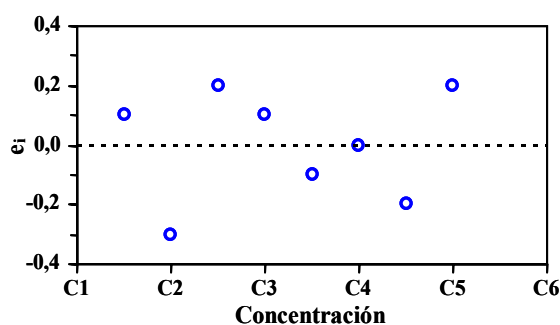


Figura 2.2 - Distribución de los residuales frente a la concentración (condición de homocedasticidad).

5.3 - Parámetros de calidad del método analítico

Los parámetros de calidad establecidos para los métodos analíticos puestos a punto a lo largo de esta Memoria son los siguientes:

- **Rango dinámico lineal y Linealidad**
- **Precisión**
- **Sensibilidad o Resolución analítica**
- **Límites de detección y cuantificación**

5.3.1 - Rango dinámico lineal y Linealidad

El rango dinámico lineal viene definido por el límite superior del intervalo de concentraciones en el que se ha aplicado el método analítico y por el límite de cuantificación de dicho método. Por otra parte, la linealidad indica el grado de ajuste de los valores de la señal medidos sobre la recta de calibrado³. Se pueden distinguir dos tipos de linealidad:

- La linealidad “*en línea*” (*in-line*) se corresponde con el valor **P** del fallo de ajuste.
- La linealidad “*sobre la línea*” (*on-line*) se define como el propio coeficiente de correlación (**r**), o como el coeficiente de determinación (**R**²). Sin embargo, valores de (**r**) muy próximos a la unidad no indican necesariamente una alta calidad de los datos analíticos. También se puede emplear la desviación estándar relativa de la pendiente, **DER**_(b), que se calcula mediante el cociente del valor de la desviación estándar de la pendiente (**S**_b) entre la pendiente (**b**), como medida matemática de la linealidad. De esa forma la linealidad viene dada por la ecuación **2.3**:

³ Analytical Methods Committee. *Is My Calibration Linear?* Analyst 119; 2363-2366, 1994

$$\text{LIN (\%)} = [1 - \text{DER}_{(b)}] \cdot 100 \quad (2.3)$$

El valor máximo de linealidad será por tanto del 100 %, de forma que cuanto más próximo esté el valor calculado para este parámetro a dicho valor, mayor será el ajuste de los datos experimentales al modelo lineal propuesto.

5.3.2 - Precisión

Este parámetro mide el grado de incertidumbre que se puede esperar de los resultados analíticos obtenidos a partir del calibrado.

Para evaluar la precisión del método analítico se estudió la fluctuación de la señal analítica correspondiente a una serie de disoluciones de concentración igual al punto central del rango dinámico lineal. De forma que la precisión vendrá estimada por el valor de la desviación estándar relativa (**DER**) de dicha señal, calculada según la ecuación 2.4:

$$\text{DER} = \left(\frac{s}{y} \right) \cdot 100 \quad (2.4)$$

donde **s** es la desviación estándar de las señales medidas, e **y** es la señal analítica media.

5.3.3 - Sensibilidad o Resolución analítica

La sensibilidad de un método analítico se puede definir como la derivada de la magnitud analítica dependiente de la concentración del analito, respecto de dicha concentración. Así, se acepta como valor de la sensibilidad el de la pendiente de la función de calibrado, denominada según la *IUPAC*, sensibilidad del calibrado⁴.

Sin embargo, la medida de la sensibilidad no debe limitarse únicamente al cálculo de la pendiente de la función de calibrado, ya que las dispersiones originadas en el proceso de calibración, influirán notablemente sobre la misma. Así, Mandel y Stiehler⁵ proponen que la sensibilidad analítica vendrá definida por el cociente entre la desviación estándar de la regresión ($S_{R,C}$ o $S_{y/x}$) y la pendiente del calibrado (\mathbf{b}), según se muestra en la ecuación 2.5:

$$S_{\text{analítica}} = \left(\frac{S_{y/x}}{\mathbf{b}} \right) \quad (2.5)$$

La desviación estándar de la regresión se calcula a partir de la ecuación 2.6:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{1}{n-2} \sum (y_i - \hat{y}_i)^2} \quad (2.6)$$

⁴ IUPAC, *Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis - II data interpretation. Analytical chemistry division*. Spectrochim. Acta B 33; 241-245, 1978.

⁵ Mandel J., Stiehler R.D., *Sensitivity - A criterion for the comparison of methods of test*. J. Res. Natl. Bur. Std. 53, 155-159, 1954.

donde $S_{y/x}$ es la desviación estándar de la regresión, y_i es la señal analítica experimental obtenida para cada valor de concentración, \hat{y}_i es el valor de la señal calculada en la recta de regresión correspondiente a la concentración c , y n es el número total de pares de puntos usados para el cálculo de la recta de calibrado.

5.3.4 - Límites de detección y cuantificación

Se puede definir el límite de detección de un método analítico como la menor concentración (C_L) o cantidad del compuesto (q) que puede ser detectada con un nivel de confianza determinado. Son varias las metodologías empleadas para la determinación del límite de detección del método analítico. A continuación, se describen algunas de estas metodologías.

a) Metodología basada en el tratamiento de la señal del blanco⁴:

Según esta metodología, al límite de detección, expresado como C_L , le corresponde una señal analítica que viene definida por la expresión 2.7:

$$X_L = X_B + k \cdot S_B \quad (2.7)$$

donde X_B es el valor medio de la respuesta del blanco; S_B la desviación estándar de dicha señal y k un factor numérico seleccionado de acuerdo con el nivel de confianza deseado.

La concentración C_L está relacionada con el valor de X_L según la expresión **2.8**:

$$C_L = \frac{(X_L - X_B)}{b} \quad (2.8)$$

donde b es la pendiente de la función de calibrado.

Sustituyendo la ecuación **2.7** en **2.8** se obtiene que el límite de detección vendrá dado por:

$$C_L = \frac{k \cdot S_B}{b} \quad (2.9)$$

Este valor C_L será un fiel reflejo del límite de detección del método, siempre que b esté bien definida.

Como regla general, se suele usar el valor $k = 3$ que proporciona un nivel de confianza del 99.86 %, asegurándose así que la magnitud analítica medida $X_L > X_B + 3 \cdot S_B$ sea debida a la presencia de analito en la muestra problema y no a las fluctuaciones del blanco.

Para calcular la desviación estándar correspondiente al blanco, se obtiene la señal analítica correspondiente a diez disoluciones blanco, empleando las condiciones instrumentales establecidas para cada método.

Por otra parte, el límite de cuantificación se define como la concentración de analito que corresponde a una señal analítica X_Q , definida por la ecuación **2.10**:

$$\mathbf{XQ} = \mathbf{XB} + \mathbf{k} \cdot \mathbf{S}_B \quad (2.10)$$

Por tanto, y siguiendo un razonamiento similar al anterior, la concentración correspondiente a este límite de cuantificación vendrá dada por la siguiente expresión:

$$C_Q = \frac{\mathbf{k} \cdot \mathbf{S}_B}{\mathbf{b}} \quad (2.11)$$

recomendándose en este caso el valor mínimo de 10 para la constante \mathbf{k} .

b) Metodología basada en la recta de calibrado⁶:

Esta metodología se basa en una estimación por extrapolación de la recta de calibrado. En primer lugar, se determina la desviación estándar de la regresión a partir de la ecuación 2.6.

A partir del valor de la desviación estándar de la regresión se puede determinar la desviación estándar de la ordenada en el origen, \mathbf{S}_a , y la desviación estándar de la pendiente, \mathbf{S}_b . Las expresiones para este cálculo vienen dadas por las siguientes ecuaciones:

$$\mathbf{S}_a = \mathbf{S}_{y/x} \sqrt{\frac{\sum \mathbf{c}_i^2}{\mathbf{n} \sum (\mathbf{c}_i - \bar{\mathbf{c}})^2}} \quad (2.12)$$

⁶ Cuadros L., García A., Jiménez C., Román M., *Estimation of performance characteristics of an analytical method using the data set of the calibration experiment*. Anal. Letter, 26; 1243-1258 1993

$$S_b = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum(c_i - \bar{c})^2}} \quad (2.13)$$

La desviación estándar de la estimación de la concentración, S_c , se puede determinar a partir de la ecuación 2.14:

$$S_c = \frac{S_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y - \bar{y})^2}{b^2 \sum(c_i - \bar{c})^2}} \quad (2.14)$$

donde m es el número de repeticiones del análisis; n es el número total de valores utilizados en la regresión lineal; y es la media aritmética de los valores obtenidos para m análisis; \bar{y} es la media aritmética de todos los valores usados en la regresión lineal; c_i es cada una de los valores de concentración del análisis; y \bar{c} es la media aritmética de todos los valores de concentración usados para la calibración. El valor de S_c depende del número de puntos de la calibración y del número de réplicas, y podría minimizarse haciendo m igual a n .

Basándose en la expresión 2.14, la desviación estándar del blanco, S_o , vendrá dado por la siguiente ecuación:

$$S_o = \frac{S_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_o - \bar{y})^2}{b^2 \sum(c_i - \bar{c})^2}} \quad (2.15)$$

donde y_o es la señal correspondiente al blanco.

Teniendo en cuenta las ecuaciones 2.5 y 2.13, la ecuación 2.15 se puede simplificar para obtener:

$$S_o = \frac{S_{y/x}}{b} \sqrt{\left(\frac{1}{m} + \frac{1}{n}\right) + \text{D.E.R.}(b) \cdot d_o^2} \quad (2.16)$$

donde d_o viene dado por la expresión $(y_o - \bar{y})$.

También se puede determinar el límite de detección solamente tomando en consideración la desviación estándar de los residuales $S_{y/x}$, la pendiente b , y estimando S_o por extrapolación de la desviación estándar del blanco.

$$S_o = \frac{S_{y/x}}{b} \sqrt{\left(\frac{n-2}{n-1}\right)} \quad (2.17)$$

donde n es el número total de valores utilizados en la regresión lineal.

Con estos datos, se calcularía los límites de detección y cuantificación aplicando las siguientes ecuaciones:

$$X_L = 3 \cdot S_o \quad (2.18)$$

$$X_Q = 10 \cdot S_o \quad (2.19)$$

c) Metodología basada en la relación señal/ruido:

La base de la metodología en función de la relación señal/ruido fue introducida por Kaiser⁷ en 1970, y desarrollada posteriormente en los años ochenta por Sharaf⁸ y colaboradores. Se basa en la estimación del ruido analítico, el cual se determina llevando a cabo la medida cromatográfica de 10 disoluciones sin analito. Para cada uno de estos cromatogramas se haya una media de la señal con su correspondiente desviación estándar. Por último, se hace la media de estos resultados y se haya una desviación estándar de estos resultados. El límite de detección vendrá dado por la expresión 2.7:

$$\mathbf{X}_L = \mathbf{X}_B + k \cdot \mathbf{S}_B \quad (2.7)$$

donde \mathbf{X}_B es la media calculada, $k = 3$, y \mathbf{S}_B es la desviación estándar antes determinada.

d) Metodología basada en la señal del “blanco cromatográfico”:

Esta metodología ha sido desarrollada por Vilchez y colaboradores⁹. Según estos autores, el calibrado correspondiente a un método cromatográfico se caracteriza por la ausencia de señal analítica correspondiente al blanco, lo cual imposibilita el cálculo del límite de detección de forma similar a la empleada para métodos espectroscópicos de análisis, y por ello se ha recurrido a lo largo del tiempo a otros

⁷ Kaiser, H., *Report for analytical chemists. II. Quantitation in elemental analysis*. Anal. Chem. 42; 26-59, 1970

⁸ Sharaf M.A., Illman D.L., Kowalski B.R., *Chemometrics*, Ed. Wiley, New York, USA, 1986

⁹ González A., Cuadros L., Alonso E., Vilchez J.L., *Estimate of gas Chromatographic blanks application to detection limits evaluation as recommended by IUPAC*. J. Chrom. A, 726; 133-139, 1996.

procedimientos como son el estudio de la mínima cantidad detectable^{10,11}, uso del término independiente de la ecuación de calibrado¹², cálculo de propagación de errores¹³ o estimación aproximada por extrapolación de la recta de calibrado⁶. Métodos que presentan numerosos problemas de tipo práctico y determinan una gran arbitrariedad en la estimación del límite de detección en cromatografía.

La propuesta realizada con objeto de evitar estos inconvenientes consiste en obtener la señal del "blanco cromatográfico" por integración directa del ruido de fondo, utilizando como límites de integración el valor extrapolado de anchura de pico (W_b) a concentración "cero". Se necesita, por tanto, conocer la variación de la anchura de pico con respecto a la concentración de analito. Para determinar esta anchura, se propone la medida de un parámetro libre de la aleatoriedad del ruido de fondo como es la anchura a mitad de pico $W_{0.5b}$, y a partir de este valor calcular W_b , considerando que el pico cromatográfico tiene un perfil Gaussiano¹⁴.

Partiendo de la expresión de una Gaussiana, adaptada al caso de los parámetros cromatográficos (**Figura 2.3**), la altura del pico a su tiempo de retención viene dada por la ecuación **2.20**:

$$h = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2} \frac{(t-t_R)^2}{s^2}} \quad (2.20)$$

¹⁰ Snyder L.R., *Practical HPLC methods development*, Ed. Wiley, Chichester, UK, 1988

¹¹ Merken H.M., Beecher G.R., *Liquid chromatographic method for the separation and quantification of prominent flavonoid aglycones*. J. Chrom. A, 897; 177-184; 2000.

¹² Miller J.M., *Basic statistical methods for Analytical Chemistry. Part 2. Calibration and regression methods. A review*. Analyst 116; 3-149, 1991.

¹³ Long G.L., Winefordner, J.D., *Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition*. Anal. Chem. 55, 712-724, 1983.

¹⁴ Klinkenberg A., Sjenitzer F., *Retention-time distributions of the gaussian type*. Chem. Engin. Sci. 5; 258-270, 1956

donde h es la altura de pico al tiempo de retención t_R , y s^2 es la varianza del pico.

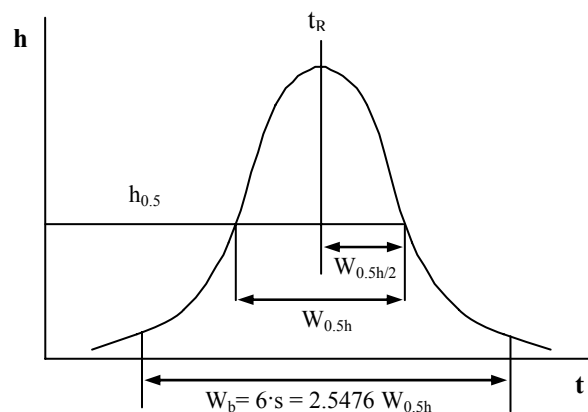


Figura 2.3 - Parámetros característicos de un pico Gaussiano.

Aplicando la expresión 2.20 a los parámetros de pico correspondientes se demuestra que la desviación estándar de pico viene dada por la expresión:

$$s = \frac{W_{0.5h}}{2} \sqrt{\frac{1}{2 \ln \frac{1}{\sqrt{2\pi} h_{0.5}}}}} \quad (2.21)$$

donde $W_{0.5h}$ es la anchura a mitad de pico y $h_{0.5}$ es la mitad de la altura del pico Gaussiano.

El valor de W_b para un 99.73% del área de pico¹⁵, vendrá dada por un valor igual a $6 \cdot s$:

¹⁵ Dyson N., *Chromatographic Integration Methods*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1990

$$W_b = 6 \cdot s = 2.548 \cdot W_{0.5h} \quad (2.22)$$

Para calcular la anchura de base a concentración “cero” (W_{b0}), dado que las dimensiones del pico cromatográfico, altura y anchura, dependen de la concentración del compuesto, se extrapola la curva resultante de representar gráficamente los valores medidos de $W_{0.5h}$ frente a la concentración correspondiente. En la *Figura 2.4* se muestra de forma gráfica el comportamiento típico de esta variable.

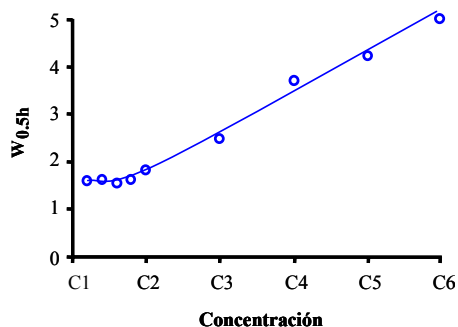


Figura 2.4 - Variación de la anchura de pico con la concentración.

En primer lugar, se determina el valor de la anchura a mitad de pico ($W_{0.5h}$) correspondiente a concentración "cero", extrapolando la curva resultante de representar gráficamente los valores medidos de $W_{0.5h}$ de diferentes picos frente a la correspondientes concentraciones de analito (*Figura 2.4*). A continuación se calcula el valor de W_{b0} aplicando la ecuación 2.22 y finalmente, se mide la señal del blanco para cada compuesto por integración sobre la línea del cromatograma del blanco en

el intervalo $t_R \pm 0.5 W_{b0}$, donde t_R es el tiempo de retención correspondiente a cada compuesto considerado. Para realizar réplicas se requiere una nueva inyección y el establecimiento de un nuevo cromatograma.

6.- VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Para llevar a cabo la validación de los diferentes métodos analíticos propuestos en esta Memoria se han aplicado dos protocolos estadísticos distintos. Por una parte se han llevado a cabo estudios realizando ensayos de recuperación; y también, se ha aplicado el protocolo estadístico propuesto por Cuadros y colaboradores¹⁶, denominado metodología de adición de patrón, en el que se compara el calibrado con patrones y con adición de patrón y se introduce el concepto de blanco de Youden.

6.1 - Ensayos de recuperación

Se lleva a cabo ensayos de recuperación en el que se calcula el porcentaje de recuperación (**Rec**) obtenido de muestras naturales en las que se ha adicionado una determinada cantidad del compuesto en estudio (muestra fortificada). Es necesario también analizar muestras no fortificadas. Tras aplicar el método analítico, se relacionan las concentraciones encontradas en las muestras fortificadas y en las muestras-blanco con la concentración añadida. El cálculo se realiza según la ecuación 2.23:

$$\text{Rec}(\%) = \frac{C_{\text{muestra fortificada}} - C_{\text{muestra no fortificada}}}{C_{\text{adicionada}}} \cdot 100 \quad (2.23)$$

¹⁶ Cuadros Rodríguez L., García Campaña A.M., Alés F., Jiménez C., Román M., *Validation of an analytical method using the standard addition methodology*. J. AOAC Int. 78; 471-476, 1995.

6.2 - Metodología de adición de patrón

Esta metodología propuesta por Cuadros y colaboradores¹⁶ implica la realización de tres experiencias de calibrado, un **calibrado con patrones (CP)**, un **calibrado de adición de patrón (CA)** y otro calibrado empleando porciones crecientes de muestra, denominado **calibrado de Youden (CY)**. La metodología de adición de patrón se puede aplicar para resolver diferentes problemáticas:

- ⇒ Determinación de analitos en muestras en las que las interacciones analito-matriz conducen a resultados inexactos al emplear la calibración con patrones.
- ⇒ Determinación de analitos, cuyo contenido en muestra es inferior al límite de cuantificación del método, pero superior a su sensibilidad analítica.
- ⇒ Comprobación de la exactitud de un resultado analítico cuando no se dispone de una muestra de referencia.

Para verificar la exactitud del método hay que desarrollar el cálculo estadístico que se esquematiza a continuación:

- 1) Se realiza un **ajuste por mínimos cuadrados de los tres calibrados (CP, CA y CY)**. De todos los parámetros estadísticos derivados de este ajuste se selecciona **n** (número de parejas de datos), **a** (ordenada en el origen), **b** (pendiente) y **S_{y/x}** (desviación estándar del calibrado).

2) Se *compara mediante un test de F de Snedecor* las varianzas del calibrado con patrones y del calibrado de adición de patrón. Las hipótesis consideradas en este test son:

Varianzas iguales $S_1^2 = S_2^2$ $F_{cal} < F_{tab} \Rightarrow$ hipótesis nula (H_0)

Varianzas distintas $S_1^2 \neq S_2^2$ $F_{cal} \geq F_{tab} \Rightarrow$ hipótesis alternativa (H_1)

Este test compara un valor del estadístico **F calculado** según la ecuación **2.24** con un valor tabulado para $(n_1 - 2)$ y $(n_2 - 2)$ grados de libertad, con un nivel de significación del 5 %, siendo n_1 y n_2 el número de puntos experimentales de cada una de las funciones de calibrado:

$$F_{cal} = \frac{S_1^2}{S_2^2}; (s_1 > s_2) \quad (2.24)$$

donde S_1^2 y S_2^2 representan las varianzas de los residuos para ambas rectas de calibrado (con patrones y adición de patrón).

3) Se realiza un *test de comparación de pendientes* para comprobar si la adición de patrón provoca un error sistemático constante, o sea que la recta de adición de patrón está desplazada paralelamente respecto a la recta del calibrado con patrones. Para lo cual se realiza el test de la **t-Student**. Se calcula el estadístico t_{cal} para $(n_1 + n_2 - 4)$ grados de libertad. Se acepta la hipótesis nula para un nivel de significación mayor del 5 %.

Si existe diferencia estadísticamente significativa entre las varianzas de los residuos **t** será calculado según la ecuación **2.25**:

$$t_{\text{cal}} = \frac{|b_1 - b_2|}{\sqrt{\frac{S_1^2}{\sum (c_1 - \bar{c}_1)^2} + \frac{S_2^2}{\sum (c_2 - \bar{c}_2)^2}}} \quad (2.25)$$

donde S_1 y S_2 representan los valores de la desviación estándar de la regresión para CP y CA, respectivamente.

El valor de **t calculado** se compara con un valor de **t tabulado** para un nivel de significación del 5 % y **f** grados de libertad, calculados según la expresión 2.26:

$$f = \frac{\frac{S_1^2}{\sum (c_1 - \bar{c}_1)^2} + \frac{S_2^2}{\sum (c_2 - \bar{c}_2)^2}}{\frac{S_1^2 / \sum (c_1 - \bar{c}_1)^2}{n_1 - 2} + \frac{S_2^2 / \sum (c_2 - \bar{c}_2)^2}{n_2 - 2}} \quad (2.26)$$

Si no existe diferencia significativa entre las varianzas se calcula la desviación estándar ponderada de regresión (S_p) a partir de las correspondientes desviaciones estándar del calibrado con patrones (S_1) y adición de patrón (S_2):

$$S_p = \sqrt{\frac{(n_1 - 2)S_1^2 + (n_2 - 2)S_2^2}{n_1 + n_2 - 4}} \quad (2.27)$$

donde n_1 y n_2 son el número de datos experimentales de cada uno de los calibrados.

El estadístico a calcular, es el mostrado a continuación:

$$t_{\text{cal}} = \frac{|b_1 - b_2|}{S_p \sqrt{\frac{1}{\sum (c_i - \bar{c})_1^2} + \frac{1}{\sum (c_i - \bar{c})_2^2}}} \quad (2.28)$$

El valor de t_{cal} se compara con el valor de t_{tab} con $(n_1 + n_2 - 4)$ grados de libertad y con un nivel de significación del 5%. Las hipótesis a tener en cuenta son las siguientes:

Pendientes iguales $b_1 = b_2$ $t_{\text{cal}} < t_{\text{tab}} \Rightarrow$ hipótesis nula (H_0)

Pendientes distintas $b_1 \neq b_2$ $t_{\text{cal}} \geq t_{\text{tab}} \Rightarrow$ hipótesis alternativa (H_1)

- Una vez comprobado que la pendiente del calibrado con patrones es igual a la pendiente del calibrado con adición de patrón, se calcula la pendiente promedio:

$$b_p = \frac{\sum (c_i - c)_1 (y_i - \bar{y})_1 + \sum (c_i - c)_2 (y_i - \bar{y})_2}{\sum (c_i - c)_1^2 + \sum (c_i - c)_2^2} \quad (2.29)$$

- Se calculan las nuevas ordenadas en el origen (\mathbf{a}') para el calibrado con patrones (\mathbf{a}'_1 o \mathbf{a}'_{CP}) y para el calibrado con adición de patrón (\mathbf{a}'_2 o \mathbf{a}'_{CA}) a partir del valor de pendiente promedio. A continuación, se compara la nueva ordenada en el origen del calibrado con patrones (\mathbf{a}'_{CP}) con la ordenada en el origen del calibrado de Youden (\mathbf{a}_Y o \mathbf{a}_{CY}), si hay diferencia entre ambas será debida a la existencia de error sistemático por efecto matriz de la muestra. En este caso no se puede realizar un test de

comparación de \mathbf{a}'_{CP} y \mathbf{a}_{CY} porque ambas están obtenidas a partir de variables independientes distintas. Para compararlas se comprueba que \mathbf{a}_{CY} está incluido en el intervalo de confianza de \mathbf{a}'_{CP} . Se utiliza un valor de **t-Student** con $(n_1 - 2)$ grados de libertad para un nivel de significación del 5 %. Si \mathbf{a}_{CY} no está incluido en el intervalo calculado, se obtiene el verdadero blanco de muestra denominado blanco de Youden:

$$\mathbf{a}'_{CA} = \mathbf{R}_{CA} - \mathbf{b}_p \cdot \mathbf{C}_{CA} \quad ; \quad \mathbf{a}'_{CP} = \mathbf{R}_{CP} - \mathbf{b}_p \cdot \mathbf{C}_{CP} \quad (2.30)$$

Intervalo de confianza de la ordenada en el origen, \mathbf{a}'_{CP} :

$$\mathbf{a}_{CY} \in \mathbf{a}'_{CP} \pm t_\alpha S_p \sqrt{\frac{\sum \mathbf{c}_{i,CP}^2}{n \sum (\mathbf{c}_{i,CP} - \bar{\mathbf{c}})^2}} \quad (2.31)$$

\mathbf{a}_Y - blanco de Youden:

$$\mathbf{a}_Y = \mathbf{a}_{CY} - \mathbf{a}'_{CP} \quad (2.32)$$

- Finalmente, se comprueba la exactitud del método analítico. Para ello se compara el contenido de analito en la disolución (C_x) calculado a partir del calibrado con patrones ($C_{x,1}$ o C_{CP}) y el calculado a partir del calibrado con adición de patrón ($C_{x,2}$ o C_{CA}). Ambos valores (C_{CP} y C_{CA}) se comparan mediante un test de **t-Student** de comparación de dos medias con $(n_1 + n_2 - 3)$ grados de libertad. Si concluimos por la hipótesis nula con un nivel de significación mayor del 5 %, ambos resultados son iguales y por tanto el método es exacto. Se calcula el estadístico:

$$t(\mathbf{c}) = \frac{|\mathbf{c}_{x,1} - \mathbf{c}_{x,2}|}{\frac{S_P}{b_P} \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} - \frac{(y_1 - y_2)^2}{b_P^2 [\sum (\mathbf{c}_{i,1} - \mathbf{c}_1)^2 + (\mathbf{c}_{i,2} - \mathbf{c}_2)^2]}}} \quad (2.33)$$

CAPÍTULO 3

**DETERMINACIÓN DE SPCs
EN MUESTRAS ACUOSAS**

En este Capítulo se desarrollan cuatro bloques bien diferenciados.

En el primero se trata la síntesis y caracterización de los ácidos sulfonilcarboxílicos (SPCs) seleccionados, etapa necesaria al no disponer de patrones comerciales de los mismos.

En el segundo bloque se expone el desarrollo de metodología analítica mediante cromatografía líquida con detección fluorescente para la determinación de los SPCs en muestras acuosas.

En el tercer bloque se hace referencia al desarrollo de metodología analítica mediante electroforesis capilar con detección con Diodos Array (DAD) para la determinación de los SPCs en muestras acuosas.

Finalmente, en el último bloque se expondrá la aplicación de la metodología desarrollada para llevar a cabo el estudio de biodegradación del tensioactivo LAS en suelo agrícola a partir del análisis de los SPCs en las aguas de riego lixiviadas.

A continuación se procede a desarrollar cada uno de los cuatro bloques comentados.

1.- SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS ÁCIDOS SULFOFENILCARBOXÍLICOS.

Para llevar a cabo la síntesis de los seis ácidos sulfofenilcarboxílicos objeto de estudio en esta Memoria se partió de los respectivos ácidos fenilcarboxílicos comerciales (ácidos fenilacético, 2-fenilpropiónico, 2-fenilbutírico, 3-fenilbutírico, 4-fenilbutírico y 5-fenilvaleriánico). En las **Figuras 3.1** y **3.2** se muestran las estructuras de los compuestos de partida y de los compuestos sintetizados.

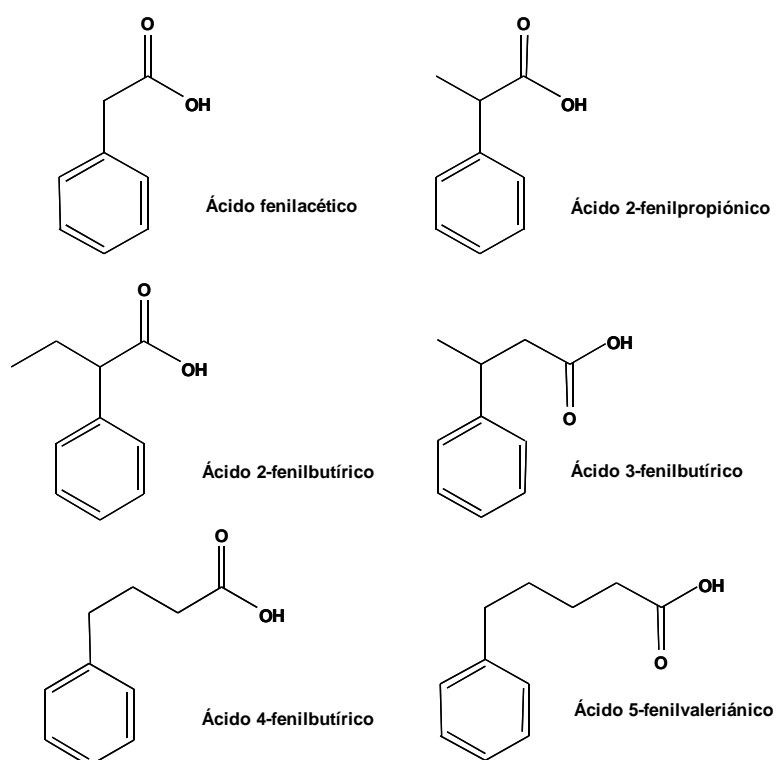


Figura 3.1 - Estructura de los ácidos fenilcarboxílico.

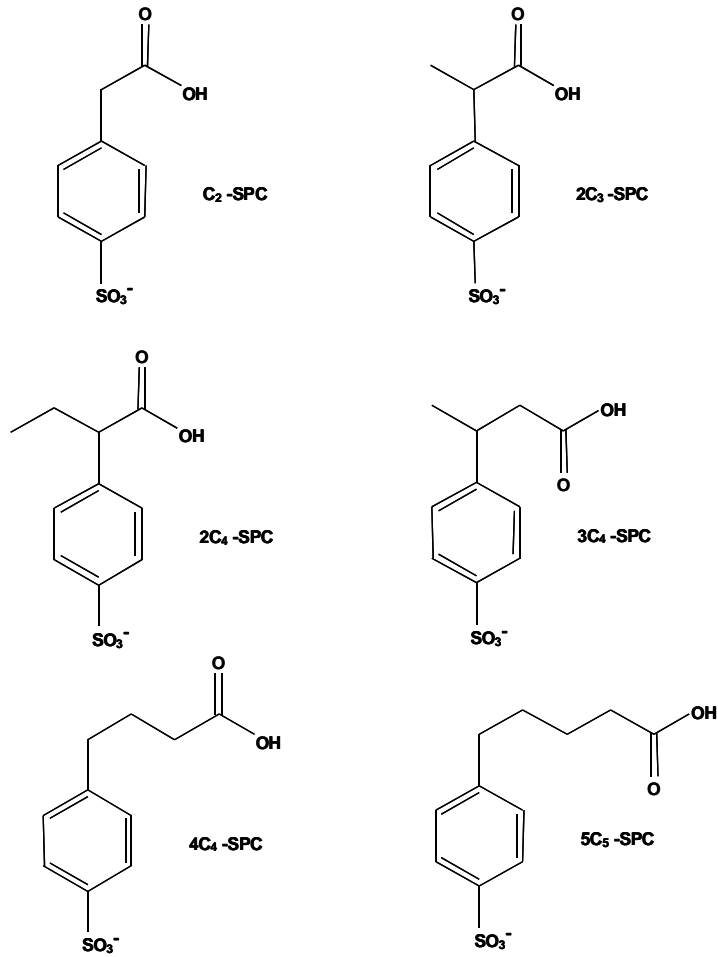


Figura 3.2 - Estructura de los ácidos sulfonilcarboxílico.

1.1 - Procedimiento operatorio para la síntesis de SPCs

El procedimiento operatorio empleado fue el siguiente:

- Se introducen 5.0 g del correspondiente ácido fenilcarboxílico en un matraz esférico de fondo plano de 250 mL de capacidad. A continuación se añaden 20 mL de H₂SO₄ concentrado y se agita en agitador magnético calentando a una temperatura constante de 60 ° C durante 24 horas.
- Transcurrido este tiempo se detiene la agitación y se saca el matraz del baño de aceite. Con una pipeta se va adicionando, lentamente y con mucho cuidado, la disolución de este matraz a otro matraz que contiene 100 mL de agua y que se encuentra sumergido en un baño de hielo con NaCl para neutralizar el calor generado en este proceso. Una vez que toda la disolución se ha trasvasado al segundo matraz, se lava el primero con un poco de agua para arrastrar los restos y se agrega al segundo matraz.
- El siguiente paso es la preparación de una columna cromatográfica. Para ello se prepara una suspensión de 50 g de amberlita XAD-4 en metanol, se agita durante una hora con agitación magnética y posteriormente se introduce en una columna de vidrio de 35 x 2.5 cm. Se lava con agua (aproximadamente 175 mL) para eliminar el metanol y se deja acondicionar la resina en el agua. A continuación se trasvasa la disolución del matraz a un embudo de decantación que se encuentra situado en la parte superior de la columna, desde donde se realiza la adición

lentamente. Se pasa la disolución a través de la columna y el eluido se recoge en un vaso de precipitado. Se lava la resina con aproximadamente 175 mL de agua, y se eluye el producto con 175 mL de metanol.

- La primera fracción eluida y el agua de lavado se adicionan nuevamente a otra columna preparada y acondicionada de igual modo que la anterior. A continuación se lava con 175 mL de agua y se eluye el producto con 175 mL de metanol. Dicha fracción se une a la obtenida anteriormente.
- Se neutraliza con hidróxido sódico al 40 %, se trasvasa la disolución a un matraz esférico de 500 mL y se lleva a sequedad en un rotavapor. El residuo que queda en las paredes se disuelve con algo menos de 100 mL de metanol caliente, se trasvasa a un vaso de precipitado y se añaden unos 200 mL de éter dietílico para precipitar el producto. Se deja reposar 1 hora aproximadamente y se filtra a través de un filtro de vidrio poroso (número 3). Se introduce el filtro con el precipitado en el desecador y se hace el vacío dejando secar durante 2 o 3 días.

Para la caracterización de los seis SPCs sintetizados se emplearon la Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C y ^1H (RMN de ^{13}C y ^1H), la Espectroscopía Infrarroja y la Espectrometría de Masas.

1.2 - Caracterización de los SPCs sintetizados

1.2.1 - Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C y ^1H

Se registraron los espectros RMN de ^{13}C y ^1H de los ácidos carboxílicos y de sus correspondientes derivados sulfonados en disolución metanólica. De su estudio se deduce que además de los productos sulfonados en posición *-para*, también se obtienen en algunos casos pequeñas cantidades del producto sulfonado en posición *-orto*, y trazas del producto de partida.

En las **Figuras 3.3 a 3.6** se recogen, a modo de ejemplo, los espectros de ^{13}C y ^1H correspondientes al ácido 2-fenilpropiónico y su producto sulfonado el ácido 2-(*p*-sulfofenil)propiónico.

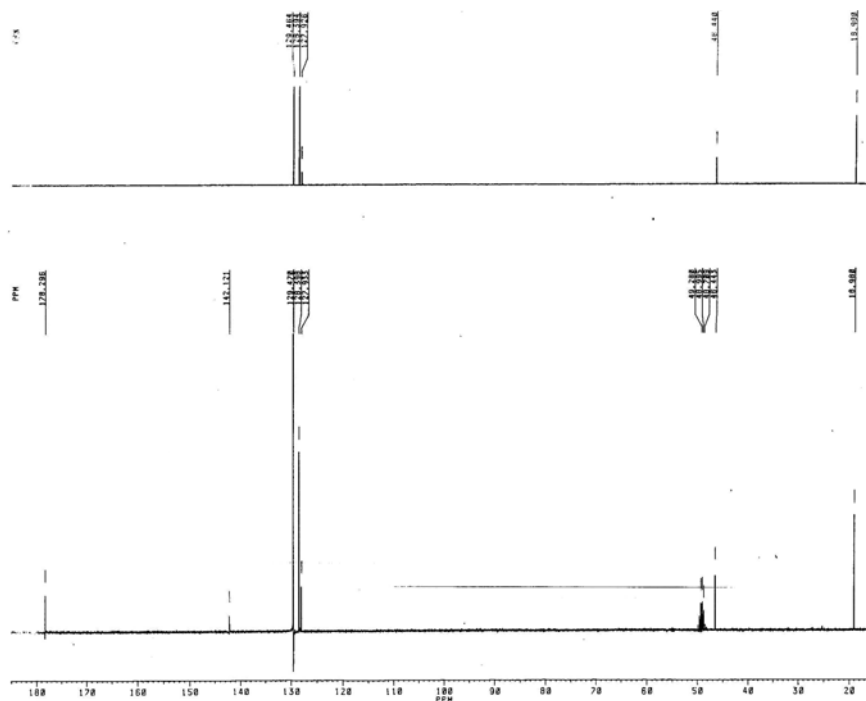


Figura 3.3 - Espectro de RMN de ^{13}C del ácido 2-fenilpropiónico.

En el espectro se observa a desplazamiento químico de 180 ppm aproximadamente, la señal correspondiente al C del grupo carboxilo; a 130 ppm la señal característica de los C sp^2 del anillo aromático; a 46 ppm aproximadamente la señal del C correspondiente al -CH y a 18 ppm la señal del C del grupo metilo. La señal centrada en 49 ppm se debe al disolvente empleado, metanol.

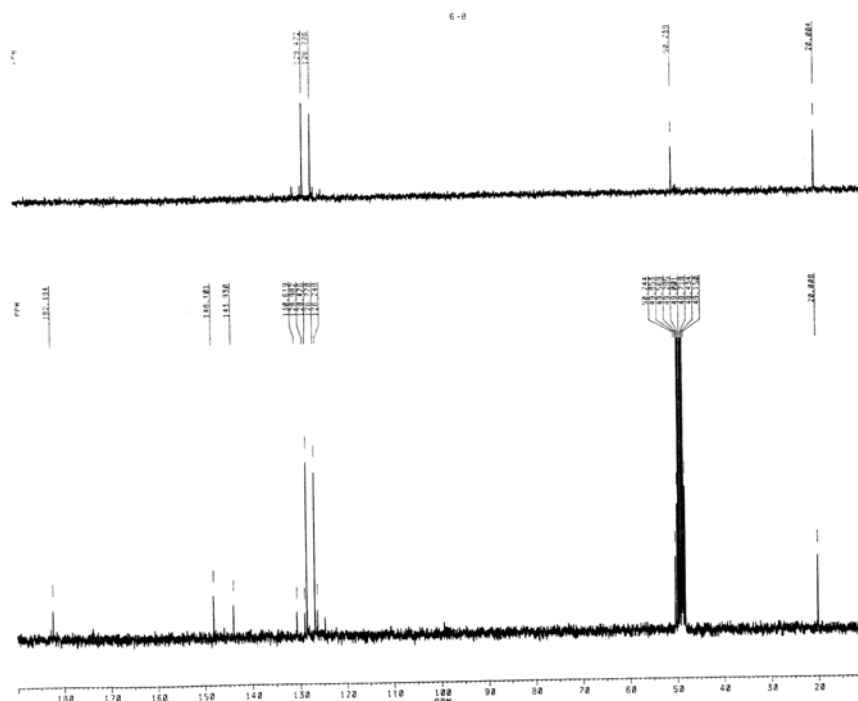


Figura 3.4 - Espectro de RMN de ^{13}C del ácido 2-(p-sulfofenil)propiónico.

El espectro de ^{13}C del producto sulfonado es similar al del producto de partida, puesto que la reacción de sulfonación no afecta la estructura carbonada. La señal intensa que aparece a 48 ppm se debe al metanol, y solapa con la señal de C correspondiente al -CH.

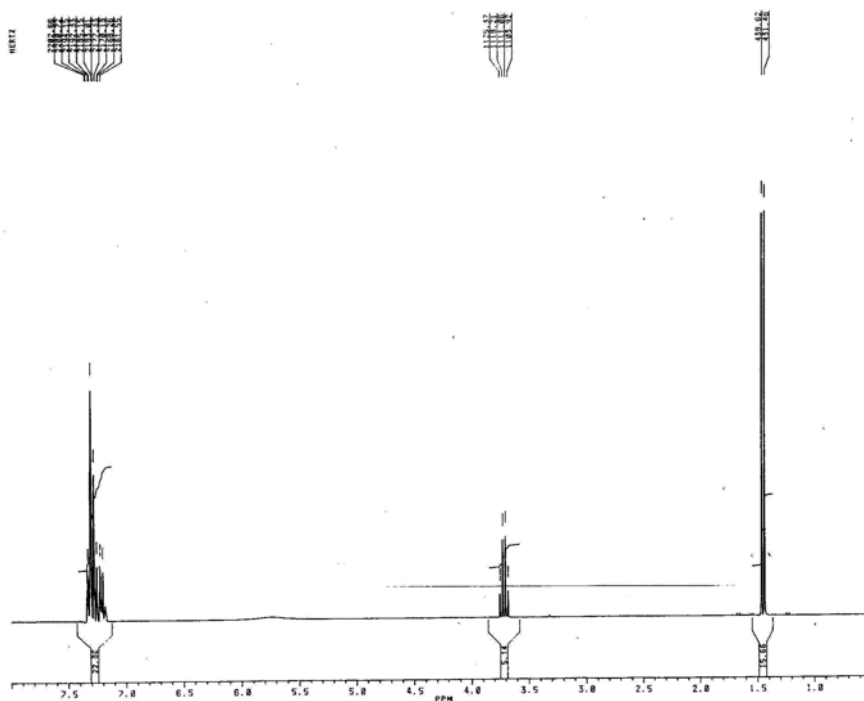


Figura 3.5 - Espectro de RMN de ^1H del ácido 2-fenilpropiónico.

En el espectro se observa a desplazamiento químico de 7.3 ppm la señal de los 5 H aromáticos, a 3.7 ppm aproximadamente la señal del H del grupo -CH y a 1.45 ppm la señal de los 3 H del grupo metilo.

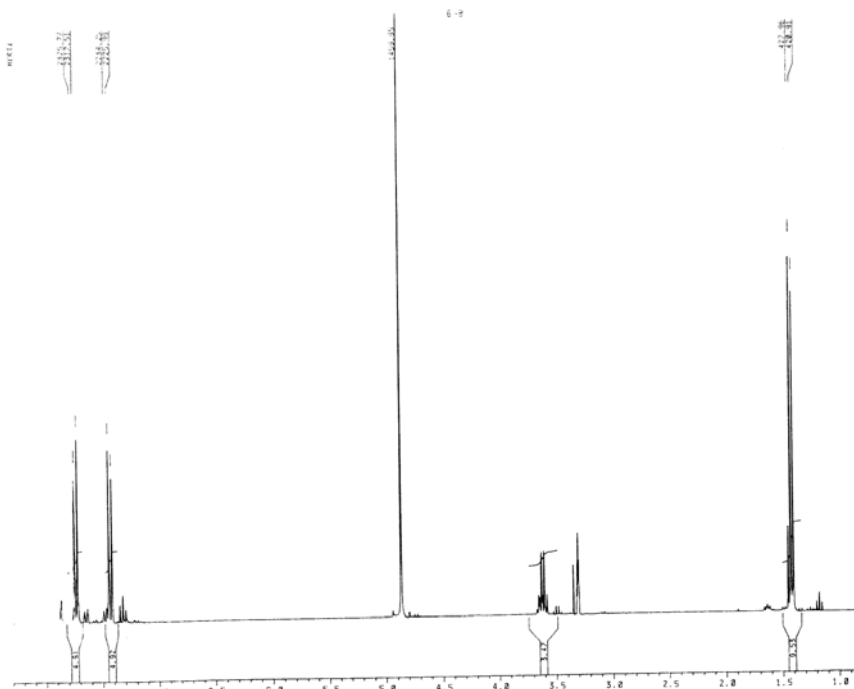


Figura 3.6 - Espectro de RMN de ^1H del ácido 2-(*p*-sulfofenil)propiónico.

En este caso se observan dos dobletes, centrados en 7.7 y 7.4 ppm, correspondientes a los H aromáticos, que confirman la sustitución en posición *-para* del producto sulfonado. A desplazamiento químico 3.6 ppm aparece la señal del H correspondiente al -CH y a 1.4 ppm la señal del grupo metilo. Por último la señal con desplazamiento químico 4.8 ppm se debe a la presencia de H_2O en la molécula y la de desplazamiento químico 3.3 ppm al disolvente.

1.2.2 - Espectroscopía de Infrarrojos

Se registraron los espectros infrarrojos de los ácidos fenilcarboxílicos y de sus correspondientes derivados sulfonados en el rango comprendido entre 400 y 4000 cm^{-1} . En las **Figura 3.7** y **3.8** se muestran, a modo de ejemplo, los espectros de IR correspondientes al ácido 2-fenilpropiónico y su producto sulfonado el ácido 2-(*p*-sulfofenil)propiónico, respectivamente.

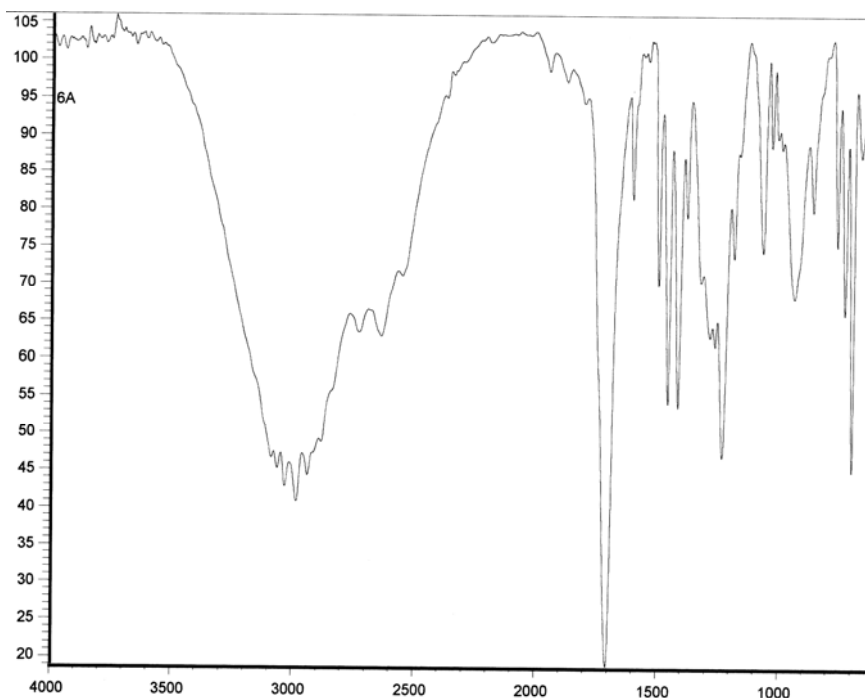


Figura 3.7 - Espectro de IR del ácido 2-fenilpropiónico.

La banda ancha que aparece centrada a 3000 cm^{-1} se debe al enlace -OH del grupo carboxilo. La elevada concentración de la muestra ha provocado el desplazamiento y ensanchamiento de esta banda, que normalmente

suele aparecer entre 3500 y 3560 cm^{-1} . La banda a 1680 cm^{-1} es característica del enlace C=O de ácidos carboxílicos aromáticos

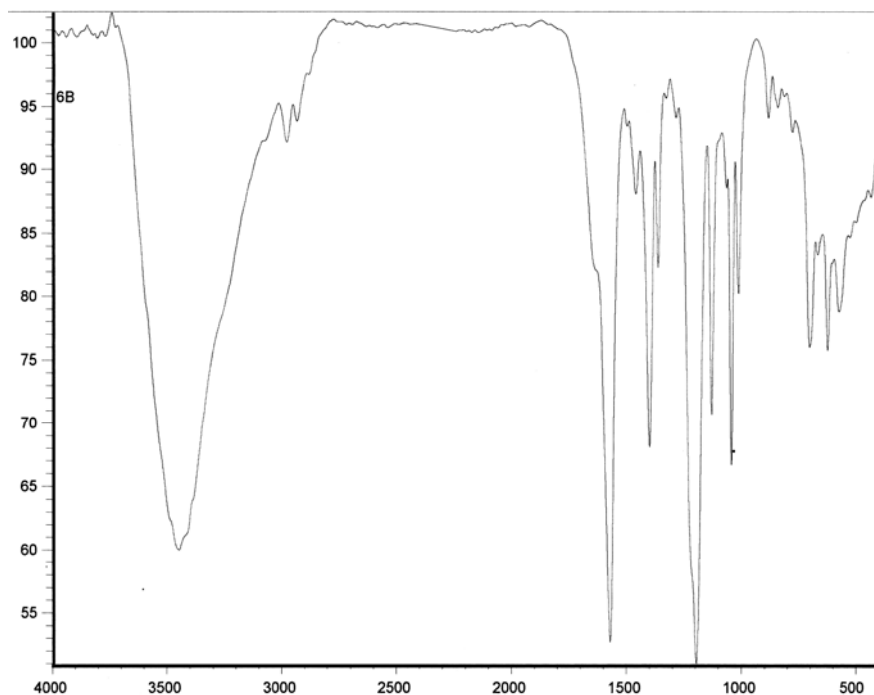


Figura 3.8 - Espectro de IR del ácido 2-(p-sulfofenil)propiónico.

En el espectro del producto sulfonado aparecen también las bandas correspondientes al enlace C=O del grupo carboxilo aromático a 1680 cm^{-1} y al enlace -OH de este mismo grupo a 3500 cm^{-1} . Sin embargo, aparecen dos nuevas bandas, a aproximadamente 1040 y 1130 cm^{-1} , que son características de los grupos sulfónicos y que no aparecen en el espectro del reactivo.

1.2.3 - Espectrometría de Masas

Se registraron los espectros de masas de los ácidos sulfonilcarboxílicos sintetizados empleando un cromatógrafo de líquidos acoplado a un espectrómetro de masas (*Waters ZQ Mass Spectrometer, Single Quadrupole*). En las *Tablas 3.1* y *3.2* se recopilan las condiciones cromatográficas y las condiciones del espectrómetro de masas que se emplearon en este estudio.

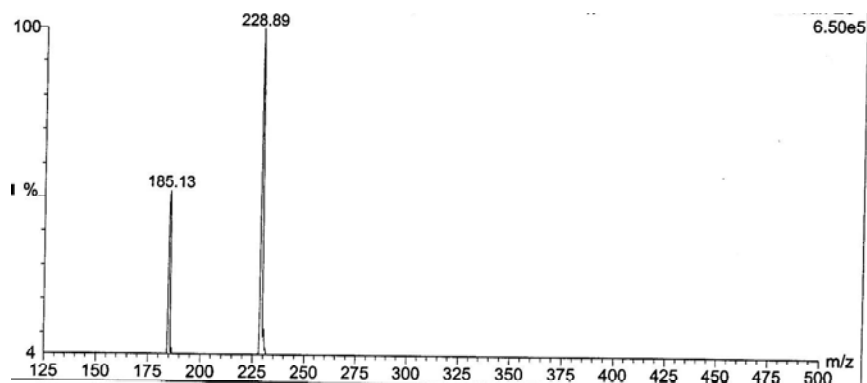
Tabla 3.1 - Condiciones cromatográficas.

Columna	Lichrocart RP-C ₁₈
Fase móvil	A: Acetonitrilo (ACN) B: Ácido trifluoroacético /amoníaco (0.2 %, pH = 2.0)
	<u><i>t (min)</i></u> <u><i>% ACN</i></u>
	7.0 5
	8.0 8
	25.0 8
Gradiente	26.0 12
	40.0 12
	41.0 18
	52.0 18
	53.0 5
	55.0 5
Flujo	0.8 mL·min ⁻¹
Flujo de entrada al masas	0.35 mL·min ⁻¹
λ	225 nm
Temperatura de columna	20 °C
Volumen de inyección	100 μ L

Tabla 3.2 - Condiciones del espectrómetro de masas.

Modo	Negativo
Voltaje capilar	2.8 KV
T^a fuente	120 °C
T^a desolvatación	350 °C
Flujo gas de desolvatación	600 L/h
Flujo gas cono	50 L/h
Voltaje cono	30 KV
Extractor	7 KV
Lentes RF	0.6 kV
Resolución	12
Energía ión	1 V

En la *Figura 3.9* se muestra, a modo de ejemplo el espectro de masas en modo SCAN del ácido 2-(*p*-sulfofenil)propiónico.



*Figura 3.9 - Espectro de masas en modo SCAN del ácido 2-(*p*-sulfofenil)propiónico.*

En la **Figura 3.10** se muestra: **a)** el espectro en modo SIM del ácido 2-(*p*-sulfofenil)propiónico ($m/z = 229$); y **b)** el pico cromatográfico obtenido para este compuesto registrado con DAD.

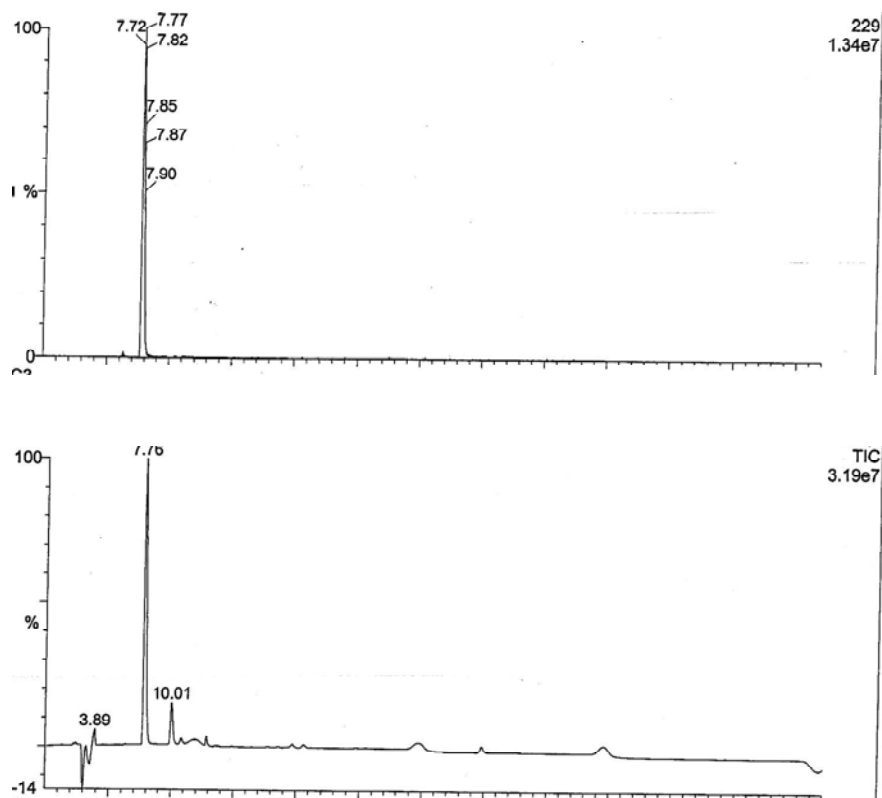


Figura 3.10 - Espectro de masas en modo SIM y pico cromatográfico registrado con DAD del ácido 2-(*p*-sulfofenil)propiónico.

Se observa que se obtiene un solo pico cromatográfico, con tiempo de retención 7.76 y con relación $m/z = 229$, que corresponde al ión molecular del compuesto estudiado.

1.3 - Rendimiento de la reacción de síntesis y pureza de los SPCs sintetizados

En la siguiente tabla aparece el rendimiento de la reacción de síntesis de cada uno de los SPCs.

Tabla 3.3 - Rendimiento de la reacción de síntesis de los SPCs.

SPC	Rendimiento (%)
C ₂ -SPC	13.5
2C ₃ -SPC	56.7
2C ₄ -SPC	44.8
3C ₄ -SPC	67.5
4C ₄ -SPC	15.8
5C ₅ -SPC	62.2

La pureza de los productos sintetizados pudo estimarse gracias a los patrones suministrados por PETRESA S.A, certificados con una pureza del 95 %. Se compararon los cromatogramas obtenidos por inyección de los patrones suministrados con los obtenidos para los patrones sintetizados, resultando ser semejantes. Por tanto se atribuyó una pureza de al menos un 95 % a los SPCs sintetizados.

2.- DESARROLLO DE METODOLOGÍA ANALÍTICA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CON DETECCIÓN FLUORESCENTE PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS SPCs EN MUESTRAS ACUOSAS

A continuación se describe la optimización de la metodología analítica desarrollada para la determinación de los SPCs en muestras acuosas mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección fluorescente.

2.1 - Optimización de las variables implicadas en el procedimiento cromatográfico

En los siguientes apartados se comentarán las variables optimizadas en la separación cromatográfica de los seis SPCs objeto de estudio:

2.1.1 - Selección de la fase estacionaria

Atendiendo a la diferencia de polaridad existente entre fase móvil y fase estacionaria, se pueden distinguir dos tipos de cromatografía líquida: cromatografía en **fase normal** (fase estacionaria más polar que la fase móvil) y cromatografía en **fase inversa** (fase estacionaria menos polar que la fase móvil).

Los rellenos más comúnmente utilizados en **fase normal** son *silice* y *alúmina*, pudiendo ser enlazados a la primera grupos funcionales polares como: *ciano*, *diol*, y *amino*. Normalmente, la fase amino (-NH₂)

proporciona un buen nivel de selectividad y una gran versatilidad dado que ofrece la posibilidad de utilizarla en fase normal, como intercambiadora aniónica débil (usando medios ácidos en la fase móvil) e incluso en fase inversa, aunque adolece de buena estabilidad química si se compara con rellenos de similares características mucho más estables aunque menos versátiles, como es el relleno compuesto de grupos ciano (-CN) enlazados al soporte de sílice.

El relleno más comúnmente utilizado en **fase inversa** es sílice enlazada a cadenas alquílicas de longitud variable que ofrecen distintos grados de polaridad. Las partículas de este relleno pueden presentarse con diferentes morfologías: partículas amorfas (ej: LiChrosorb, Merck), o partículas con esferas simétricas (ej: LiChrospher, Merck; Zorbax, Agilent Technologies, Symmetry, Waters; Luna, Phenomenex). Las partículas con morfología de esferas simétricas proporcionan un empaquetamiento uniforme con una elevada resistencia física y química, además se favorece la reacción de enlace entre la base silícea y la fase enlazada (C_8 , C_{18} ,...), mejorando así la eficiencia de la columna.

El poder de resolución de este tipo de rellenos radica en las interacciones hidrofóbicas existentes entre las cadenas hidrocarbonadas que conforman la fase enlazada y la parte apolar de las moléculas de analito. De este modo, cuanto mayor sea la longitud de la cadena alquílica de la fase estacionaria, mayor será la interacción entre ésta y el analito, mayor será también el número de equilibrios establecidos o platos teóricos (N) y mayor, por tanto, el poder de resolución. Así se puede saber, a priori, que el mayor poder resolutivo vendrá dado por rellenos donde la base silícea ha sido enlazada a cadenas alquílicas largas, normalmente cadenas de 18 carbonos (C_{18}).

Además, a medida que aumenta la longitud de la columna cromatográfica, aumentará el poder resolutivo, ya que el número de platos teóricos será mayor también.

Teniendo en cuenta todas estas consideraciones y que en la bibliografía consultada los rellenos C_{18} son los más comúnmente usados para la determinación de LAS y sus metabolitos en diversas matrices ambientales, se escogió la columna *Lichropher RP-18*, 250 x 4.6 mm, con 5 μ m de tamaño de partícula (Merck) para llevar a cabo la separación de los analitos.

Para este primer ensayo las condiciones cromatográficas usadas fueron:

Tabla 3.4 - Condiciones cromatográficas para la obtención del cromatograma recogido en la Figura 3.9.

Condiciones cromatográficas		
Inyección	10 μ L	
Flujo	1.0 mL \cdot min ⁻¹	
Temperatura	40 °C	
Fase Móvil	A: ACN B: Ácido fórmico/formiato amónico 0.5 M, pH = 2.5	
	Tiempo (min)	% ACN
Gradiente	12	4
	20	10
	35	10
Detección	λ_{exc} : 225 nm / λ_{em} : 300 nm	
Ganancia	16	

A continuación se recoge el cromatograma obtenido con una disolución acuosa de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cada uno de los SPCs objeto de estudio.

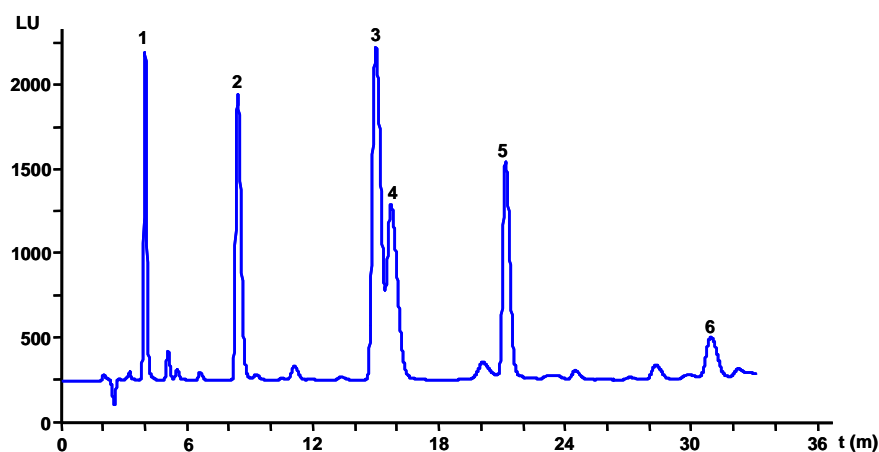


Figura 3.11 - Cromatograma para una disolución de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cada SPC. La asignación de los picos es la siguiente: (1) C_2 -SPC; (2) $2C_3$ -SPC; (3) $4C_4$ -SPC; (4) $3C_4$ -SPC; (5) $2C_4$ -SPC; (6) $5C_5$ -SPC.

2.1.2 - Estudio de la composición de la fase móvil

Fue necesario estudiar la influencia de las siguientes condiciones para proporcionar un mejor desempeño en la separación cromatográfica.

2.1.2.1 - Estudio del comportamiento de diferentes disoluciones reguladoras sobre la resolución de los SPCs.

Con este estudio se pretende seleccionar la disolución reguladora más adecuada para conseguir el mejor compromiso entre resolución y tiempo de análisis empleado.

Para mejorar la resolución de los picos solapados se probó a sustituir la disolución reguladora ácido fórmico/formiato amónico por ácido trifluoroacético/trifluoroacetato amónico, en una concentración 20 mM y el resto de condiciones las definidas inicialmente (*Tabla 3.4*). En la *Figura 3.12* se muestra el cromatograma obtenido con este nuevo tampón.

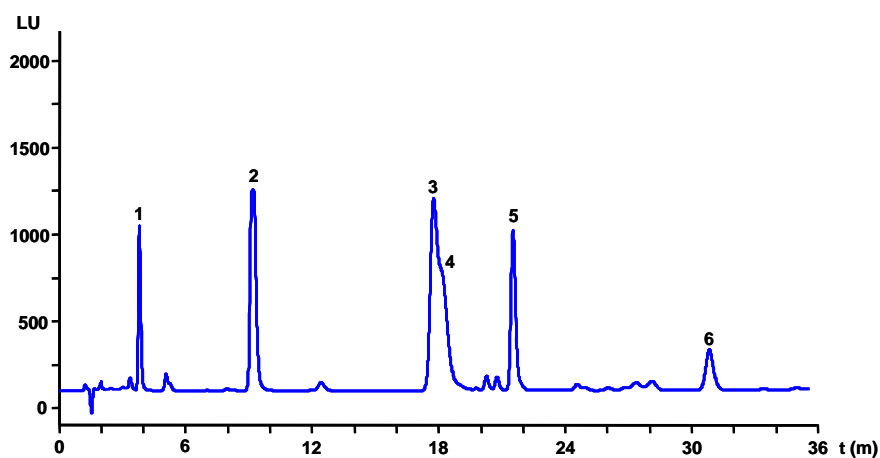


Figura 3.12 - Cromatograma para una disolución acuosa de $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de cada SPC empleando el tampón trifluoroacetato. La asignación de los picos es igual a la de la Figura 3.9.

Se observa que la resolución de los picos correspondientes a los isómeros $4\text{C}_4\text{-SPC}$ y $3\text{C}_4\text{-SPC}$ es mucho menor que la conseguida con la disolución reguladora de formiato, apareciendo estos picos completamente solapados cuando se usa la disolución reguladora de trifluoroacetato. Por esta razón, se escogió la primera para continuar con la optimización de la composición de la fase móvil.

2.1.2.2 - Estudio del pH de la fase móvil

Otro aspecto a tener en cuenta es el pH de la fase móvil. La tolerancia de columnas en fase reversa en general recomienda no trabajar a un valor de pH mayor de 8.0 ó inferior a 2.0 aproximadamente. Se ensayaron valores de pH comprendidos entre 2.0 y 4.0, en intervalos de 0.5 unidades.

Del estudio de la influencia del pH se desprende que en este rango de trabajo, esta variable afecta significativamente a los tiempos de retención debido al carácter ácido de los SPCs, que protonan su grupo carboxílico a valores de pH por debajo de su pKa (~ 4). Al disminuir el pH, disminuye la afinidad de los analitos por la fase estacionaria, reduciendo de esta forma los tiempos de retención de los mismos. En la **Tabla 3.5** aparecen reflejados los valores de tiempos de retención para el pico correspondiente al 2C₃-SPC y el valor de resolución (*P*) para los picos correspondientes al 3C₄-SPC y 4C₄-SPC.

Tabla 3.5 - Variación de los tiempos de retención y la resolución en función del pH del tampón formiato.

pH de la fase móvil	Tiempo de retención (min)	Resolución (P)
2.0	8.25	0.51
2.5	9.48	0.51
3.0	10.74	0.52
3.5	11.99	0.52
4.0	13.23	0.53

El ensayo a pH = 2.0 permite obtener el tiempo de análisis más reducido sin afectar de forma significativa a la resolución de los picos correspondientes al 3C₄-SPC y 4C₄-SPC. Por tanto se escogió pH = 2.0 como pH de trabajo.

2.1.2.3 - Optimización del gradiente de composición de la fase móvil

Se ensayaron distintos gradientes para obtener una mejor resolución de los picos correspondientes a los isómeros 3C₄-SPC y 4C₄-SPC. Para ello se planteó variar el porcentaje de acetonitrilo desde 5 % hasta 12 %, variando los tiempos, hasta obtener una separación adecuada con tiempo de análisis relativamente corto. Como resultado de este ensayo, se eligió el gradiente que aparece en la *Tabla 3.6*.

Tabla 3.6 - Gradiente seleccionado para la separación de SPCs.

Tiempo (min)	% ACN
15.0	5
17.5	8
27.5	8
31.0	12
35.0	12
37.0	5

2.1.3 - Estudio de las longitudes de onda de medida

La longitud de onda de excitación inicial se seleccionó registrando los espectros de absorción molecular UV-Vis de disoluciones acuosas de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de cada uno de los SPCs estudiados.

Este estudio permitió verificar que todos los analitos presentan tres máximos de absorción: el más intenso, alrededor de los 195 nm; un segundo aproximadamente a 225 nm y un tercero a 270 nm. Se descartó usar como longitud de onda de excitación 195 nm al objeto de evitar interferencias, optando por el segundo a 225 nm.

Para obtener el máximo de emisión se realizó un barrido de emisión entre 250 y 350 nm excitando a 225 nm, empleando el mismo detector de fluorescencia acoplado al cromatógrafo de líquidos, puesto que permite realizar barridos tanto de emisión como de excitación de manera casi instantánea a diferentes tiempos a lo largo de todo el cromatograma.

El barrido de emisión se recoge en forma de representación tridimensional (*Figura 3.13*), donde en uno de los ejes se sitúa la variable tiempo, en otro se sitúa la longitud de onda de emisión y en el tercero se dispone la intensidad de fluorescencia:

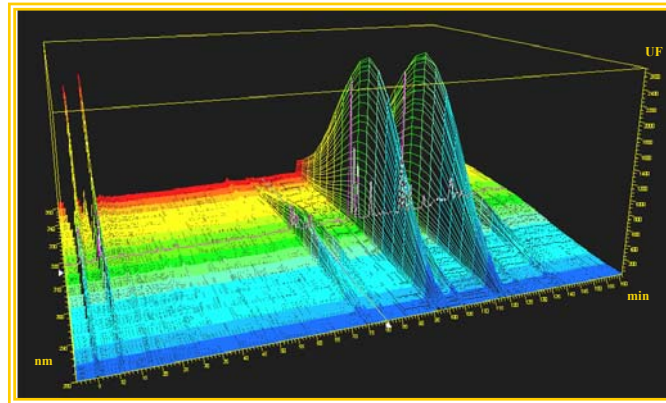


Figura 3.13 - 3D de emisión para la determinación de SPCs.

Como resultado de este estudio se seleccionó 310 nm como longitud de onda de emisión, valor al que la relación señal/ruido es óptima.

En la **Tabla 3.7** aparecen recogidas las longitudes de onda de medida seleccionadas.

Tabla 3.7 - Longitudes de onda de medida.

	Determinación de SPCs
λ_{ex} (nm)	225
λ_{em} (nm)	310

2.1.4 - Influencia de la ganancia del tubo fotomultiplicador

El detector de fluorescencia empleado ofrece la posibilidad de modificar el voltaje aplicado al fotomultiplicador mediante el control de la “ganancia” en un intervalo de 1 a 18.

En este apartado se estudia la influencia de este factor sobre la señal analítica obtenida mediante la evaluación de la relación señal/ruido a valores de ganancia comprendida entre 10 y 18 en intervalos de 2. Para esto se tomó como referencia el 2C₃-SPC, cuantificando el valor de la relación señal/ruido por medio de la relación entre la altura de pico desde la base del cromatograma y la altura del ruido de fondo que aparece junto a este pico.

Los resultados obtenidos de este estudio se muestran en la **Figura 3.14**.

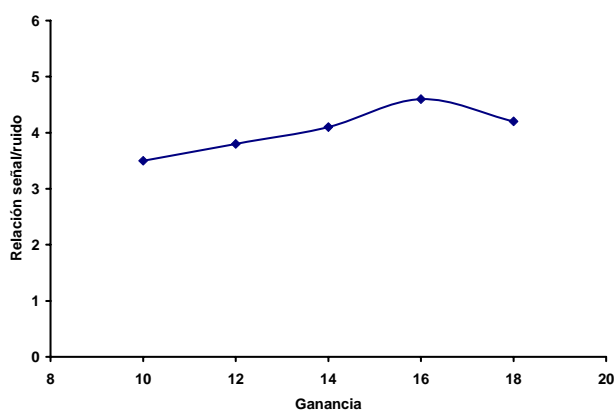


Figura 3.14 - Influencia de la ganancia del fotor multiplicador sobre la relación señal/ruido.

Como puede observarse, la mayor relación señal/ruido se obtiene cuando la ganancia se fija en un valor de 16, que es el valor que se había utilizado hasta el momento. Por tanto se continuó trabajando con este valor en los siguientes experimentos.

2.1.5 - Influencia de la temperatura de la columna

La temperatura de columna debe ser controlada para obtener así resultados reproducibles, ya que tanto la viscosidad de la fase móvil como el rendimiento de fluorescencia de los analitos son fenómenos que se ven influenciados en gran medida por esta variable. Por tanto, se debe emplear un sistema para controlar la temperatura de la columna.

Un aumento en la temperatura representa una disminución en la viscosidad de la fase móvil y por tanto una disminución en la presión del sistema, mejorando así la eficiencia de la separación, pero también implica una disminución en la señal de fluorescencia emitida por los analitos debido a procesos de desactivación no radiativos. Además, a temperaturas elevadas se puede producir la hidrólisis de la fase estacionaria y la consiguiente pérdida de eficacia y resolución en la separación. En la **Tabla 3.8** se muestra la variación en el tiempo de retención y la resolución en función de la temperatura del sistema.

Tabla 3.8 - Tiempo de retención y resolución a diferentes temperaturas de trabajo.

Temperatura de la columna	Área *	Tiempo de retención *	Resolución **
20 °C	14989.3	9.49 min	0.80
30 °C	13505.4	8.33 min	0.81
40 °C	12395.8	7.01 min	0.82

* Datos referidos al pico del 2C₃-SPC.
** Resolución referida a la pareja formada por los isómeros 4C₄- y 3C₄- SPC

Los procesos de desactivación no radiativos provocan una disminución considerable del área del pico siendo esta disminución similar en el resto de analitos (más de un 8 % al pasar de 20 a 40 °C). La resolución no experimenta un cambio significativo al aumentar la temperatura, aunque sí se consigue disminuir el tiempo de análisis. Se decidió seleccionar 20 °C como temperatura de trabajo debido a la necesidad de conseguir un método sensible, puesto que estos analitos suelen encontrarse en muy bajas concentraciones en el medio ambiente.

2.1.6 - Influencia del volumen de inyección

En este apartado se describe cómo afecta el volumen de muestra inyectado sobre la resolución y la sensibilidad. Se estudiaron volúmenes de inyección que variaron entre 10 y 100 μL .

Cabría esperar que la anchura de banda se incrementara a medida que se aumenta el volumen de inyección; sin embargo, los resultados obtenidos, mostrados en la **Tabla 3.9**, ponen de manifiesto que este parámetro prácticamente no afecta a la resolución de los isómeros utilizados como referencia. Sí se observa, sin embargo, un notable incremento en el área del pico cromatográfico correspondiente al 2C₃-SPC seleccionado para el estudio, aunque el comportamiento es extensible a cualquiera de los picos cromatográficos implicados. De hecho el aumento experimentado al pasar de 10 a 100 μL es mayor a 900 % lo cual implica un aumento sustancial en la sensibilidad del método.

Tabla 3.9 - Influencia del volumen de inyección sobre la resolución y la sensibilidad.

Volumen de inyección	Resolución	Área
10 µL	0.80	3017.8
20 µL	0.80	6069.1
30 µL	0.79	9093.1
50 µL	0.79	15151.4
80 µL	0.78	24242.3
100 µL	0.78	27667.5

Se optó, por utilizar el volumen de inyección máximo de 100 µL para mejorar la sensibilidad del método analítico.

2.1.7 - Resumen de las condiciones óptimas de trabajo

En la **Tabla 3.10** se recogen las condiciones experimentales seleccionadas como óptimas para la determinación simultánea de los seis ácidos sulfonilcarboxílicos estudiados, mediante LC-FD.

Tabla 3.10 - Resumen de los parámetros cromatográficos empleados para la determinación de SPCs en muestras acuosas.

Columna	Lichrocart RP-C ₁₈	
Fase móvil	A: ACN B: tampón formiato (0.5 M, pH = 2.0)	
Gradiente	<u><i>t</i> (min)</u>	<u>% ACN</u>
	15.0	5
	17.5	8
	27.5	8
	31.0	12
	35.0	12
Flujo	1 mL·min ⁻¹	
	λ_{ex}	225 nm
	λ_{em}	310 nm
Ganancia del FM	16	
Temperatura de columna	20 °C	
Volumen de inyección	100 µL	

En la **Figura 3.15** se muestra el cromatograma obtenido para los seis SPCs estudiados a una concentración de 5 µg·L⁻¹, usando los parámetros de la **Tabla 3.10** e incorporando también el ácido *p*-bencenosulfónico con una concentración de 50 µg·mL⁻¹, compuesto que posteriormente se usará como patrón interno en la optimización del procedimiento de extracción en fase sólida, en el establecimiento de la función de calibración y validación del método.

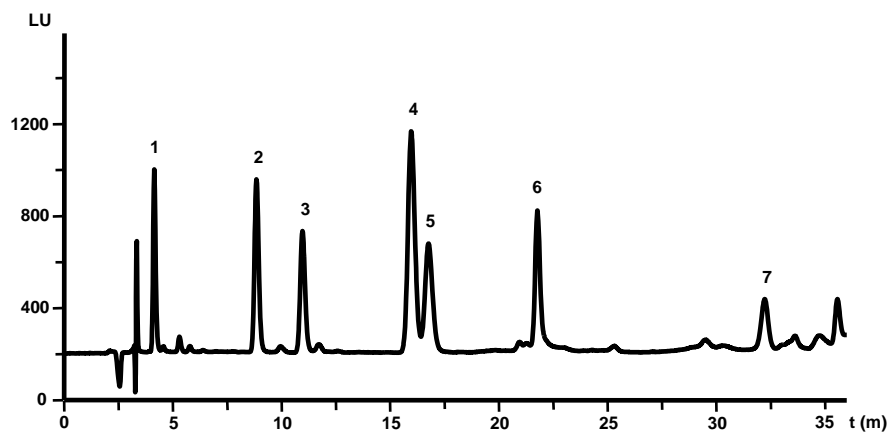


Figura 3.15 - Cromatograma correspondiente a la determinación de SPCs. La asignación de los picos es la siguiente: (1) C_2 -SPC; (2) $2C_3$ -SPC; (3) IS; (4) $4C_4$ -SPC; (5) $3C_4$ -SPC; (6) $2C_4$ -SPC; (7) $5C_5$ -SPC.

2.2 - Optimización de variables implicadas en la SPE

A continuación se comenta la optimización de la etapa de purificación y/o concentración empleando el procedimiento de extracción en fase sólida.

2.2.1 - Selección del tipo de adsorbente

Debido a características de los SPCs como su elevada polaridad y pKa inferior a 4, se optó por ensayar dos tipos de adsorbentes: SAX, que es un relleno intercambiador aniónico, muy usado para retener aniones débiles; y ENV+, que es un relleno polimérico de poliestireno divinilbenceno hidroxilado altamente entrecruzado, muy empleado para extraer analitos que son muy solubles en agua y que pueden tener problemas para ser extraídos con rellenos de sílice.

Se llevó a cabo la optimización del procedimiento SPE usando cada uno de estos rellenos de forma independiente para finalmente discutir cuál era el más adecuado.

2.2.2 - Procedimiento de SPE con adsorbentes de SAX

En la **Tabla 3.11**, se muestran las condiciones iniciales seleccionadas para el procedimiento de SPE usando los adsorbentes *SAX*.

Tabla 3.11 - Condiciones iniciales de SPE usando cartuchos SAX.

Etapa	Procedimiento	Reactivos/condiciones
Extracción en Fase Sólida con cartuchos <i>SAX</i>	1) Acondicionamiento	2 mL n-Hexano + 2mL MeOH
	2) Carga	10 mL muestra acuosa
	3) Lavado	5 mL H ₂ O
	4) Elución	2 mL MeOH

Se llevó a cabo el análisis de sus respectivas áreas relativas (área de analito/área del patrón interno) comparadas con el área relativa de los mismos patrones pero sin ser sometidos a la SPE, conteniendo la misma concentración que tendría la disolución si la recuperación fuera del 100 %. De esta forma se obtuvo las recuperaciones de cada uno de los SPC estudiados.

Usando las condiciones iniciales mostradas en la **Tabla 3.11** se observó que la recuperación de los analitos era notablemente baja, en torno al 10 %. Este hecho se puede atribuir a que el metanol puro no es suficientemente efectivo para eluir analitos tan polares como los SPCs. Para solventar este problema, se decidió acidificar el disolvente mediante la adición de ácido clorhídrico, 37 % v/v. Se ensayaron distintas concentraciones de ácido, desde 0 a 12 M, en intervalos de 2 M, observándose que la recuperación aumentaba al incrementar la concentración de ácido hasta llegar a la concentración 10 M, y a partir de ahí se mantenía constante (**Tabla 3.12**). Se eligió una disolución metanólica 10 M de HCl como disolvente de elución.

Tabla 3.12 - Recuperaciones (%) obtenidas para cada SPC en función de la concentración de HCl en el metanol de elución.

SPC	sin HCl	2 M	4 M	6 M	8 M	10 M	12 M
C ₂	7	24	48	59	75	89	90
2C ₃	9	21	34	48	64	76	74
2C ₄	11	20	31	37	40	44	45
3C ₄	12	24	40	51	66	74	75
4C ₄	11	35	60	77	86	91	90
5C ₅	13	32	58	79	87	90	90

A continuación se ensayaron distintos volúmenes de carga acuosa, 10, 25, 50 y 100 mL, comprobando que con cargas superiores a 10 mL las recuperaciones disminuían de forma considerable, especialmente para los analitos más polares (**Tabla 3.13**). Por tanto, el volumen de carga escogido fue 10 mL.

Tabla 3.13 - Recuperaciones (%) obtenidas para cada SPC en función del volumen de carga usado.

SPC	10 mL	25 mL	50 mL	100 mL
C ₂	90	49	36	25
2C ₃	75	51	42	33
2C ₄	44	32	23	19
3C ₄	76	61	50	42
4C ₄	90	79	66	54
5C ₅	91	80	69	55

Con respecto a la etapa de lavado se estudió el efecto de acidificar el agua de lavado con un 2 % de ácido acético, permitiendo este cambio obtener cromatogramas con menos ruido de fondo que usando sólo agua.

Por último, se ensayaron volúmenes de elución entre 2 y 5 mL, concluyendo que 2 mL eran suficientes (*Tabla 3.14*).

Tabla 3.14 - Recuperaciones (%) obtenidas para cada SPC en función del volumen de elución usado.

SPC	2 mL	3 mL	5 mL
C ₂	91	89	90
2C ₃	75	77	75
2C ₄	44	45	45
3C ₄	76	74	77
4C ₄	90	92	89
5C ₅	91	89	90

En la **Tabla 3.15**. se resumen las condiciones optimizadas para el procedimiento de SPE usando los adsorbentes SAX.

Tabla 3.15 - Condiciones optimizadas de SPE usando cartuchos SAX.

Etapa	Procedimiento	Reactivos/condiciones
Extracción en Fase Sólida con cartuchos SAX	1) Acondicionamiento	2 mL n-Hexano + 2mL MeOH
	2) Carga	10 mL muestra acuosa
	3) Lavado	5 mL H ₂ O, 2 % AcOH
	4) Elución	2 mL MeOH 10 M en HCl

2.2.3 - Procedimiento de SPE con adsorbentes de ENV+

En la **Tabla 3.16** se muestran las condiciones iniciales seleccionadas teniendo en cuenta la bibliografía consultada para el procedimiento de SPE usando los adsorbentes ENV+.

Tabla 3.16 - Condiciones iniciales SPE usando cartuchos ENV+.

Etapa	Procedimiento	Reactivos/condiciones
Extracción en Fase Sólida con cartuchos ENV+	1) Acondicionamiento	6 mL MeOH + 6mL H ₂ O (pH 3, acido acético)
	2) Carga	10 mL carga acuosa a pH=3 con ac. acético
	3) Elución	2 mL MeOH:DCM (9:1 v/v)

Las recuperaciones obtenidas usando las condiciones iniciales mostradas en la **Tabla 3.16** se encontraban en torno al 15 %.

De acuerdo con la bibliografía consultada, la eficiencia de extracción de moléculas polares usando columnas ENV+ puede verse muy influenciada por el pH. Por esta razón, se evaluó el efecto que ejercía tamponar la carga y usar una disolución reguladora en lugar de agua acidificada para realizar el acondicionamiento de los cartuchos. Se escogió la disolución reguladora fosfato/fosfórico, por ser adecuado en el intervalo de pH de trabajo. De este modo, la carga se tamponó con 1 mL de disolución reguladora 500 mM a pH = 3.0, manteniendo el volumen de carga final en 10 mL, y el acondicionamiento se realizó con 6 mL de metanol seguidos de 6 mL de disolución reguladora fosfato/fosfórico 50 mM a pH = 3.0. Con esta modificación las recuperaciones se situaron entre el 45 % para el C₂-SPC, y el 70 % para el 2C₄-SPC.

Posteriormente se evaluó el efecto del pH de la disolución reguladora en las recuperaciones. Se ensayaron valores de pH comprendidos entre 1.5 y 3.5 en intervalos de 0.5 unidades, comprobando que al disminuir el pH aumentaban las recuperaciones de forma significativa. Se escogió pH 1.5 para las siguientes pruebas de optimización del procedimiento SPE. Las recuperaciones a este valor de pH oscilaban entre el 55 % para el C₂-SPC y el 85 % para el 2C₄-SPC.

Con respecto a la etapa de elución se estudió el efecto de la naturaleza del disolvente. Se probaron disolventes y mezclas frecuentemente empleados con los cartuchos ENV+ como son: metanol/diclorometano (MeOH:DCM, 9:1, v/v); metanol con 0.1% (v/v) de ácido fórmico;

acetato de etilo con 1% de ácido acético y acetona con 0.2% de ácido trifluoroacético. Las recuperaciones más elevadas se obtuvieron usando como disolvente de elución el usado hasta ahora, la mezcla MeOH:DCM 9:1 (v/v).

El siguiente paso fue estudiar cómo afectaba el volumen de carga a las recuperaciones. Se probaron volúmenes entre 10 y 100 mL, comprobando que el aumento del volumen de carga afectaba negativamente a las recuperaciones, especialmente a las de los analitos más polares C₂-SPC y 2C₃-SPC, 10 y 45 %, respectivamente, para 100 mL de carga. Por tanto, se optó por usar un volumen de carga de 10 mL.

Finalmente se ensayaron volúmenes de elución entre 2 y 5 mL, verificando que las recuperaciones aumentaban al pasar de 2 a 3 mL de volumen de elución, permaneciendo estables a partir de este valor (*Tabla 3.17*). Se seleccionó por tanto 3 mL como volumen de elución.

Tabla 3.17 - Recuperaciones (%) obtenidas para cada SPC en función del volumen de elución usado.

SPC	2 mL	3 mL	5 mL
C ₂	53	62	64
2C ₃	65	75	74
2C ₄	84	93	91
3C ₄	74	82	82
4C ₄	66	76	75
5C ₅	75	87	89

En la **Tabla 3.18** se recogen las condiciones optimizadas del procedimiento SPE usando cartuchos ENV+.

Tabla 3.18 - Condiciones optimizadas de SPE usando cartuchos ENV+.

Etapa	Procedimiento	Reactivos/condiciones
Extracción en Fase Sólida con cartuchos ENV+	1) Acondicionamiento	6 mL MeOH + 6mL tampón fosfato (50 mM, pH = 1.5)
	2) Carga	10 mL carga acuosa tamponada
	3) Elución	3 mL MeOH:DCM (9:1, v/v)

2.2.4 - Selección del procedimiento de SPE

En la **Tabla 3.19** se recogen las recuperaciones obtenidas para cada SPC usando cartuchos SAX y cartuchos ENV+.

Tabla 3.19 - Recuperaciones obtenidas para cada SPC con los procedimientos de extracción en fase sólida desarrollados.

SPC	SAX Rec. (%)	ENV+ Rec. (%)
C ₂	90	62
2C ₃	75	75
2C ₄	45	93
3C ₄	75	82
4C ₄	90	76
5C ₅	90	87

Las recuperaciones obtenidas después de la optimización de ambos procedimientos de SPE usando los dos tipos de adsorbente, son del mismo orden salvo para el caso del 2C₄-SPC. En base a este dato y teniendo en cuenta que las condiciones de elución del procedimiento con adsorbentes SAX son muy severas, se seleccionó el procedimiento basado en el uso de cartuchos ENV+.

2.2.5 - Procedimiento operatorio para la SPE

En la *Tabla 3.18* se muestra el procedimiento operatorio adoptado finalmente para el tratamiento de muestras acuosas

Con objeto de mejorar la sensibilidad del método analítico se partió de 100 mL de muestra acuosa y se evaporó en rotavapor hasta un volumen menor de 9 mL. El volumen final, después de añadir 1 mL de tampón fosfato 500 mM a pH 1.5 y agua Milli-Q hasta el enrase, debía ser 10 mL, puesto que es el volumen de carga óptimo del procedimiento de SPE.

Tras la etapa de elución, se realizó la evaporación total del eluato bajo corriente de nitrógeno a 40 °C, redisolviéndolo a continuación en un volumen final de 1.0 mL de agua Milli Q. De esta forma, además de proporcionar una etapa de limpieza, el procedimiento de SPE permite preconcentrar los analitos 10 veces.

Por tratarse inicialmente de disoluciones patrón no fue necesaria una etapa de eliminación de partículas en suspensión. Sin embargo, en muestras medioambientales acuosas, suele ser imprescindible una etapa previa de

filtración o centrifugación. Por este motivo el procedimiento seguido con las muestras fue el siguiente: se centrifugan 100 mL de muestra a 4000 r.p.m. durante 10 minutos para eliminar así la materia en suspensión que pudieran contener. A continuación, se evapora en rotavapor hasta un volumen menor de 9 mL, se adiciona 1 mL de disolución reguladora fosfato/fosfórico 500 mM a pH 1.5 y agua Milli Q hasta un volumen final de 10 mL. La muestra así preparada, se pasa a través de una columna de extracción en fase sólida con adsorbente ENV+, quedando retenidos los analitos por procesos de adsorción hidrofóbica. Los analitos se eluyen con 3 mL de una mezcla MeOH:DCM (9:1 v/v), a continuación se evapora el disolvente en corriente de nitrógeno, calentando a 40 °C y finalmente se redissuelve con 1 mL de agua Milli-Q. La disolución concentrada de SPCs, se introduce en un vial cromatográfico y se analiza mediante LC-FD fijando las variables instrumentales descritas anteriormente.

Para llevar a cabo la extracción en fase sólida se usó una cámara de vacío que posee una serie de canales mediante los cuales se puede controlar el flujo del proceso de extracción y que es conocida como sistema o cámara de vacío múltiple. Esta cámara se muestra en la **Figura 3.16**.

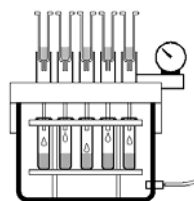


Figura 3.16 - Cámara de vacío múltiple utilizada en el proceso de extracción en fase sólida.

Mediante el procedimiento de SPE se eliminan los posibles interferentes que puedan acompañar a los SPCs en las muestras acuosas previo a la aplicación del método cromatográfico. Además, esta etapa desempeña una función de preconcentración del analito. El factor de concentración es 100 ya que el volumen inicial de muestra acuosa es 100 mL y el volumen final de muestra es 1 mL.

2.3 - Parámetros analíticos del método cromatográfico.

A continuación se comentan los parámetros analíticos obtenidos a partir de los datos experimentales.

2.3.1 - Establecimiento y verificación del modelo

El modelo de calibración seleccionado fue el lineal de regresión univariante por mínimos cuadrados. Como patrón interno se empleó el ácido *p*-sulfobenzoico y las curvas de calibración se establecieron usando el cociente área analito/área patrón interno, frente a concentración de analito.

Para establecer las curvas se siguió el procedimiento que se describe a continuación. En una serie de matraces aforados de 100 mL, se prepararon patrones de concentración creciente (1.0; 5.0; 10.0; 30.0; 50.0; y 100 ng·mL⁻¹). Cada disolución se evaporó en rotavapor hasta un volumen final menor de 9 mL, se trasvasó a un matraz aforado de 10 mL de capacidad, se añadió 1 mL de disolución reguladora de fosfato 500 mM a pH 1.5 y agua Milli-Q hasta enrase. Posteriormente se llevó a cabo el

procedimiento de extracción en fase sólida descrito en el apartado anterior y finalmente se procedió al análisis cromatográfico. Se realizaron 3 réplicas experimentales y 2 instrumentales para cada nivel de concentración.

En la **Tabla 3.20** se muestran los parámetros estadísticos del modelo seleccionado para el método:

Tabla 3.20 - Parámetros estadísticos para la determinación de SPCs mediante LC-FD.

SPC	b (L·μg ⁻¹)	S_b	a	S_a	R^2 (%)	$S_{y/x}$	P_{lof} (%)
C_2	0.0305	0.0002	0.0062	0.0024	99.92	0.0103	88.0
$2C_3$	0.0637	0.0004	0.0025	0.0064	99.86	0.0282	56.1
$2C_4$	0.0620	0.0002	0.0002	0.0034	99.96	0.0146	64.9
$3C_4$	0.0770	0.0003	-0.0007	0.0047	99.95	0.0207	28.4
$4C_4$	0.1271	0.0004	0.0268	0.0070	99.96	0.0303	12.6
$5C_5$	0.0625	0.0003	-0.0080	0.0050	99.92	0.0216	37.3

Para la verificación del modelo, se realizaron los siguientes estudios:

- 1) Evaluación del *fallo de ajuste* (P_{Loj}), para determinar la tendencia lineal de los datos. Como se observa en la **Tabla 3.20** en todos los casos el valor P fue mayor del 5 %, por tanto se concluye que no existe curvatura, es decir, los datos se ajustan a un modelo lineal.
- 2) Evaluación de homogeneidad de varianzas, condición de *homocedasticidad*. Se empleó el análisis visual de los gráficos de los

residuos. Se observó que se cumplían las premisas fijadas en todos los casos. Por tanto, se puede afirmar que los datos son homocedásticos.

2.3.2 - Parámetros de calidad del método analítico

2.3.2.1 - Límite de detección y cuantificación

Para el cálculo de estos parámetros se siguió la metodología basada en la recta de calibrado, descrita en el apartado 5.3.4 del **Capítulo Experimental: Materiales y Métodos** (opción b). En la **Tabla 3.21** se presentan los resultados obtenidos:

Tabla 3.21 - Límites de detección y cuantificación para la determinación de SPCs mediante LC-FD.

SPC	LD (ng·mL ⁻¹)	LQ (ng·mL ⁻¹)
C ₂	0.3	1.1
2C ₃	0.4	1.2
2C ₄	0.2	0.7
3C ₄	0.2	0.8
4C ₄	0.2	0.7
5C ₅	0.3	1.0

2.3.2.2 - Rango dinámico lineal y Linealidad

En la **Tabla 3.22** se muestran los valores obtenidos para el rango dinámico lineal (RDL), la linealidad (LIN), la desviación estándar relativa (DER) y la sensibilidad analítica ($S_{\text{analítica}}$).

Tabla 3.22 - RDL, LIN (%), DER (%) y sensibilidad analítica para cada SPC.

SPC	RDL (ng·mL ⁻¹)	LIN (%)	DER (%)	S _{analítica} (ng·mL ⁻¹)
C ₂	1-100	99.51	0.49	0.34
2C ₃	1-100	99.72	0.28	0.44
2C ₄	1-100	99.65	0.35	0.24
3C ₄	1-100	99.59	0.41	0.27
4C ₄	1-100	98.28	1.72	0.24
5C ₅	1-100	99.39	0.61	0.34

En todos los casos la linealidad “on line” es superior al 95%. Se puede afirmar por tanto que los datos experimentales se ajustan al modelo lineal.

2.3.2.3 - Precisión

Con el fin de evaluar la precisión del método analítico se estimó la repetibilidad intra e inter día. Para ello, se fortificaron muestras de agua que no contenían los analitos objeto de estudio a tres niveles de concentración para cada SPC (25, 50 y 75 ng·mL⁻¹). Se llevó a cabo el análisis de cada nivel de concentración para cada uno de los analitos durante tres días (para cada día se preparaban muestras fortificadas nuevas). Las disoluciones fueron tratadas mediante el procedimiento de extracción en fase sólida ya descrito con anterioridad e inyectadas en el cromatógrafo de líquidos fijando las condiciones instrumentales optimizadas. Las recuperaciones se calcularon comparando los resultados analíticos de las muestras extraídas con patrones a los que no se les aplicó

el procedimiento de extracción y que representaban el 100% de recuperación. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 3.23**.

Tabla 3.23 - Recuperaciones (%) intra e interdía y precisión (DER, %)*
* Media de seis determinaciones. DER (%): desviación estándar relativa.

SPC	Nivel de concentración (ng·mL ⁻¹)			
	Día	25	50	75
C ₂	1	64 (2)	61 (2)	63 (2)
	2	61 (2)	63 (1)	62 (2)
	3	63 (1)	62 (1)	61 (2)
2C ₃	1	74 (2)	72 (2)	75 (2)
	2	76 (1)	74 (2)	76 (1)
	3	77 (2)	75 (2)	73 (2)
2C ₄	1	94 (2)	92 (3)	92 (2)
	2	96 (3)	94 (2)	93 (1)
	3	92 (2)	95 (2)	91 (2)
3C ₄	1	84 (2)	80 (2)	81 (2)
	2	81 (2)	82 (1)	84 (2)
	3	85 (3)	83 (2)	82 (2)
4C ₄	1	74 (2)	75 (2)	76 (2)
	2	77 (2)	77 (2)	78 (3)
	3	75 (1)	78 (2)	74 (2)
5C ₅	1	86 (2)	88 (2)	85 (3)
	2	89 (3)	86 (2)	87 (2)
	3	86 (2)	85 (3)	88 (2)

Se observa que, en todos los casos, la desviación estándar relativa es menor del 10% y se puede concluir que el método es preciso.

2.3.2.4 - Sensibilidad o Resolución analítica

De acuerdo con los datos experimentales obtenidos, las resoluciones analíticas calculadas para cada componente se muestran en la **Tabla 3.22**.

2.4 - Validación del método cromatográfico desarrollado

La validación de la metodología propuesta para la determinación de SPCs por cromatografía líquida con detección fluorescente se llevó a cabo usando agua de pozo, procedente de la zona no saturada de una parcela agrícola de la Vega de Granada, situada a 5 Km de esta ciudad. Previamente se confirmó usando el método propuesto por Del Olmo y colaboradores¹, que los niveles de LAS en este agua no eran significativos de acuerdo con el límite de detección encontrado (21 ng·mL⁻¹).

Las muestras para llevar a cabo la validación se prepararon usando 100 mL del agua de pozo, fortificada en los mismos niveles de concentración que los que se emplearon para el calibrado y tratando las muestras como los estándares de calibrado siguiendo el procedimiento descrito a lo largo de este capítulo.

Se llevó a cabo un ensayo de recuperación con muestras fortificadas, en el que se compararon los valores de concentración teóricos con los encontrados empleando el método propuesto. El test estadístico aplicado fue el de comparación de una media experimental con un valor conocido

¹ Del Olmo M., Garballo A., Nimer M., López I., De Ferrer J.A., Vilchez J.L., *Development of methodologies for different degrees of resolution of Linear Alkylbenzene Sulfonates in groundwater and wastewater by Liquid Chromatography using sodium dodecyl sulphate*. *Chromatographia* 60; 157-164, 2004.

basado en el estadístico *t-student*. Los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 3.24**.

A los datos obtenidos se les aplicó el test de la **t-student**, encontrando que los valores de t_{calc} fueron en todos los casos inferiores a los valores de t_{tab} , resultando en la aceptación de la hipótesis nula (no hay diferencias significativas entre las concentraciones encontradas y las añadidas) y demostrándose con esto que el método desarrollado produce resultados veraces.

Se puede afirmar por tanto que el método propuesto es exacto para todos los analitos con un nivel de significación mayor del 5%.

Tabla 3.24 - Veracidad del método para la determinación de seis SPCs en aguas mediante LC-FD.

SPC	Veracidad				
	Conc. añadida (ng·mL ⁻¹)	Conc. encontrada (ng·mL ⁻¹)	Rec. (%)	t _{calc.}	P (%)
C₂	5	5.0 ± 0.1	99	1.12	31
	10	10.1 ± 0.1	101	1.03	35
	20	20.0 ± 0.2	100	0.54	61
	40	40.1 ± 0.6	100	0.59	58
	80	79.5 ± 0.8	99	1.47	20
2C₃	5	5.0 ± 0.1	100	0.54	61
	10	10.0 ± 0.1	101	1.50	19
	20	19.9 ± 0.2	100	1.43	21
	40	40.3 ± 0.7	101	0.97	38
	80	80.3 ± 0.9	100	0.76	48
2C₄	5	5.0 ± 0.1	100	0.34	75
	10	9.9 ± 0.2	99	1.01	36
	20	19.8 ± 0.3	99	1.94	11
	40	40.4 ± 0.6	101	1.39	22
	80	80.1 ± 0.5	100	0.71	51
3C₄	5	5.0 ± 0.1	101	0.94	39
	10	9.9 ± 0.1	100	1.16	30
	20	19.9 ± 0.3	99	1.25	27
	40	40.1 ± 0.5	100	0.62	57
	80	79.5 ± 0.6	99	2.00	10
4C₄	5	5.0 ± 0.1	100	0.27	80
	10	10.0 ± 0.1	100	0.80	46
	20	19.9 ± 0.2	99	1.52	19
	40	40.2 ± 0.4	101	1.36	23
	80	79.8 ± 0.7	100	0.70	52
5C₅	5	5.0 ± 0.1	99	0.88	42
	10	9.9 ± 0.1	101	1.50	19
	20	20.1 ± 0.3	101	1.03	35
	40	39.7 ± 0.5	99	1.69	15
	80	79.6 ± 0.8	100	1.33	24

3.- DESARROLLO DE METODOLOGÍA ANALÍTICA MEDIANTE CE-DAD PARA LA DETERMINACIÓN DE SPCs EN MUESTRAS ACUOSAS

En este apartado se propone una nueva metodología analítica para llevar a cabo la determinación de SPCs en muestras acuosas mediante electroforesis capilar.

La electroforesis capilar ha demostrado ser una técnica de separación que permite la resolución de mezclas muy complejas. Para ello, es necesario tener en cuenta los distintos factores que afectan a la separación y que son comentados a continuación.

3.1 - Factores que afectan a la separación electroforética

Los factores que afectan a la separación electroforética pueden clasificarse en tres grupos:

- Factores relacionados con la dispersión.
- Factores relacionados con el medio electroforético.
- Factores operacionales.

3.1.1 - Factores relacionados con la dispersión

El ensanchamiento de los picos electroforéticos en CE se debe a un conjunto de factores tales como la *difusión*, *adsorción* y *efecto térmico*

cuya combinación va a afectar, de forma aditiva, a la eficacia de la separación.

El fenómeno de difusión está provocado por la existencia de gradientes de concentración que favorecen el transporte hacia las zonas de menor concentración de cada especie mientras que el fenómeno de adsorción se produce por la interacción entre los analitos cargados y disueltos en el medio electroforético y las paredes del capilar. Para reducir la adsorción de los analitos se pueden emplear disoluciones reguladoras para aumentar o disminuir el pH, hacer una limpieza del capilar entre cada análisis, adicionar modificadores de las paredes del capilar o adicionar modificadores a la disolución reguladora.

Sin embargo, se puede decir que el fenómeno que más afecta al ensanchamiento de los picos es el efecto térmico o *efecto Joule* que se origina por la aplicación de un voltaje a través de un capilar que contiene una disolución conductora, generándose un calor que puede no ser uniforme a lo largo de todo el sistema de separación. El hecho de que exista este efecto va a afectar considerablemente a la eficacia, tiempos de migración, volúmenes de inyección de la muestra y respuesta del detector. Debido a que la mayoría de estos factores dependen de la temperatura, el ensanchamiento de los picos electroforéticos se evita, en gran medida, llevando a cabo la termostatación del equipo, además de utilizar capilares de diámetros comprendidos entre 50 y 75 μm para mantener una buena relación superficie / volumen, minimizando así el efecto térmico.

3.1.2 - Factores relacionados con el medio electroforético

El transporte de la corriente eléctrica en las separaciones electroforéticas tiene lugar a través de los medios electroforéticos que suelen ser disoluciones reguladoras. El tipo de disolución reguladora elegido es de vital importancia en CE.

El pH es el factor que más afecta a la selectividad electroforética. En general, se puede afirmar, que para separar solutos catiónicos y asegurar su completa protonación, se debe trabajar a un pH de una o más unidades por debajo de su pK_b , mientras que si se trata de separar solutos aniónicos, para asegurar la ionización completa del compuesto, se debe trabajar a un pH de una o más unidades por encima de su pK_a .

Además del pH, la fuerza iónica de la disolución reguladora tiene efectos muy importantes en la movilidad de los solutos y, por tanto, en la eficacia, resolución y sensibilidad de un sistema de separación por CE, por lo que habrá que llevar a cabo una optimización tanto del tipo, composición y concentración de la disolución reguladora encaminada a la obtención de los resultados óptimos.

Por último, aunque no por ello menos importante, los aditivos añadidos a las disoluciones reguladoras, tales como *agentes complejantes*, *disolventes orgánicos* o *modificadores orgánicos* (microemulsiones, ciclodextrinas, micelas, fluidos supercríticos, etc.) son de vital importancia para mejorar o incluso facilitar la separación electroforética.

Generalmente, estos aditivos suelen ser *disolventes orgánicos* que se añaden a la disolución reguladora para alterar su polaridad y viscosidad y,

como consecuencia de ello, modificar tanto el flujo electroosmótico (FEO) como la movilidad electroforética de los analitos que componen una muestra. Además, hay casos en los que la adición de disolventes orgánicos es imprescindible debido a que los analitos objeto de estudio no son solubles directamente en la disolución reguladora acuosa y la presencia de estos disolventes en el medio electroforético es obligada.

3.1.3 - Factores operacionales

Los factores operacionales más importantes a estudiar en una separación electroforética son el *campo eléctrico* aplicado, las *características del capilar* empleado en la separación y la *temperatura* del sistema.

El flujo electroosmótico es directamente proporcional al *campo eléctrico* (E) aplicado y éste, a su vez, viene dado como el cociente entre el voltaje (V) y la longitud total del capilar (L_T), por lo que cambiando el voltaje se podrá modificar fácilmente el flujo electroosmótico. En general, un aumento en el voltaje aumenta el FEO y reduce los tiempos de migración, obteniéndose tiempos de análisis más cortos. Sin embargo, habrá que llegar a una solución de compromiso, pues al trabajar con voltajes muy elevados, los análisis serán cortos pero darán lugar a una mayor producción de calor que si no se disipa rápidamente, alterará la viscosidad de la disolución reguladora y, por tanto, se obtendrán picos más anchos, tiempos de migración menos reproducibles o descomposición de la propia muestra a analizar.

Como es de suponer, la parte más importante de un instrumento de CE es el capilar y, por tanto, las *características del capilar* serán unos de los

parámetros operacionales que habrá que seleccionar antes de llevar a cabo un análisis. Las características que definen un capilar son: diámetro interno y externo, y longitud total. Van a afectar, principalmente, al tiempo de migración, resolución, disipación del calor generado y sensibilidad de la detección.

En todo momento se está relacionando los parámetros de separación con la temperatura del sistema, por lo que el control de la misma durante la separación va a ser fundamental para asegurar una buena repetibilidad de los tiempos de migración y la precisión en el área de los picos electroforéticos. Si el calor que se va generando por aplicación del voltaje se disipa bien, es decir, se mantiene constante la temperatura del sistema, se pueden utilizar voltajes altos y aumentar la eficacia y resolución de la separación, así como acortar los tiempos de análisis. En general, la temperatura más habitual en las separaciones electroforéticas es la cercana a la temperatura ambiente, siendo el rango aceptable entre 20-50 °C.

3.2 Condiciones experimentales preliminares

El equipo de electroforesis utilizado fue un ^{3D}HP (Agilent Technologies, Waldbron, Alemania) equipado con un detector de diodos array, un compartimento de termostatación del capilar, una fuente de alto voltaje y una bandeja automuestreadora.

La separación se llevó a cabo con un capilar de sílice fundida recubierto con una capa de poliimida de 58.5 cm de longitud total, 75 µm de diámetro interno y con una longitud efectiva de 50 cm. Antes de utilizar el capilar por primera vez, se acondicionó con una disolución de NaOH 1 M

durante 15 minutos a 45 °C seguido de agua Milli-Q durante 10 minutos. El acondicionamiento habitual realizado al inicio de cada sesión fue de 10 minutos con una disolución de NaOH 0.1 M seguido de 10 minutos con agua Milli-Q, a la temperatura de trabajo para posteriormente pre-acondicionar durante 10 minutos con la disolución electroforética antes de la inyección de la muestra. Después de cada inyección se realiza un post-acondicionamiento pasando una disolución de NaOH 0.1 M durante 5 minutos y agua Milli-Q durante otros 5 minutos. Con estos pre- y post-acondicionamientos aseguramos la reproducibilidad de los electroferogramas y la estabilidad de los tiempos de migración.

Las parámetros instrumentales inicialmente seleccionados teniendo en cuenta las características de los analitos, se presentan en la **Tabla 3.25**.

Tabla 3.25 - Parámetros instrumentales electroforéticas iniciales.

Condiciones operacionales	
Polaridad	Negativa
Voltaje	- 20 kV
Temperatura	25 °C
Capilar	Longitud total:58.5 cm Diámetro interno: 75 µm Longitud efectiva: 50 cm
Inyección	Presión, 50 mbar, 10 s
λ DAD	225 nm

Se usó polaridad negativa (el desplazamiento de iones se produce del cátodo al ánodo) porque los ácidos sulfonilcarboxílicos al ionizarse adquieren dos cargas negativas que serían fuertemente repelidas por el cátodo y darían lugar a tiempos de análisis excesivamente largos en el caso de usar polaridad positiva.

El pH de trabajo debía encontrarse como mínimo una unidad por encima del pKa de los SPCs (~ 4.0), para asegurar la completa ionización de los mismos. Se seleccionó pH 5.5 y como tampón el acetato amónico/ácido acético por tener un pKa próximo al pH del trabajo. Se decidió añadir 30 % de isopropanol (IPA) a la disolución reguladora ya que al trabajar con polaridad negativa y presentar los SPCs dos cargas negativas al pH de trabajo, podría pensarse en principio, que un aumento en la viscosidad de la disolución electroforética, podría proporcionar una mejor resolución de picos.

Por otra parte, los valores de T^a y voltaje seleccionados así como la longitud y diámetro del capilar empleado para esta prueba inicial son valores frecuentemente empleados con esta técnica.

El electroferograma obtenido con estas condiciones iniciales se muestra en la **Figura 3.17**.

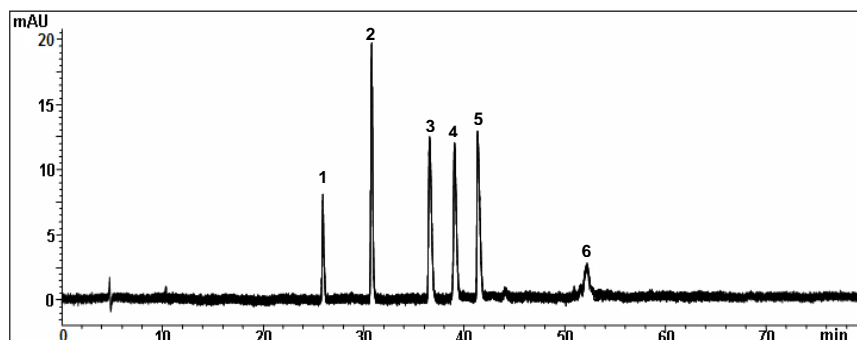


Figura 3.17 - Electroferograma obtenido empleando la disolución reguladora acetato amónico/ácido acético 50 mM, pH= 5.5, 30 % IPA y las condiciones operacionales de la Tabla 3.21. Identificación de picos: (1) ácido (p-sulfofenil)acético; (2) ácido 2-(p-sulfofenil)propiónico; (3) ácido 2-(p-sulfofenil)butírico; (4) ácido 3-(p-sulfofenil)butírico; (5) ácido 4-(p-sulfofenil)butírico; (6) ácido 5-(p-sulfofenil)valeriánico.

Aparecen seis picos completamente resueltos aunque el tiempo de análisis es excesivamente largo, superior a 50 minutos, y además es bastante irreproducible. Para disminuir el tiempo de análisis se probó a adicionar un modificador del flujo electroosmótico. El bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) es uno de los surfactantes más empleados cuando se usa polaridad negativa en la separación electroforética. Actúa adsorbiéndose en la superficie del capilar a través de interacciones electrostáticas y/o hidrofóbicas originando de esta forma un cambio en el sentido del flujo electroosmótico. Su adición suele provocar la disminución de los tiempos de migración y la mejora de la reproducibilidad, por ello, se incorporó a la disolución electroforética en una concentración de 1 mM. La **Figura 3.18** muestra el electroferograma obtenido con esta modificación siendo el resto de condiciones experimentales las inicialmente establecidas.

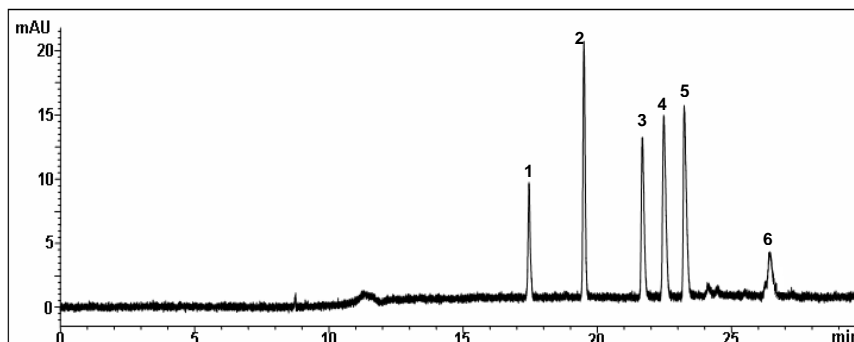


Figura 3.18 - Electroferograma obtenido empleando la disolución reguladora acetato amónico/ácido acético 50 mM, pH= 5.5, 30 % IPA, 1 mM CTAB y las condiciones operacionales de la Tabla 3.21. La identificación de picos es la que aparece en la Figura 3.16.

Al añadir CTAB a la disolución electroforética hemos provocado un cambio en el sentido del FEO, que ahora actuaría a favor del desplazamiento de los SPCs al ánodo, disminuyendo de esta forma los tiempos de migración y consecuentemente el tiempo de análisis.

3.3 Optimización de las variables experimentales implicadas en el proceso electroforético

A continuación se describe la influencia ejercida por las principales variables experimentales que afectan a la separación electroforética de la mezcla de los seis SPCs estudiados.

Todos los estudios se han llevado a cabo usando una disolución mezcla de los patrones de los SPCs con una concentración de $30 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$.

3.3.1 Influencia del pH

El pH es el parámetro que más influye en la separación de los analitos ya que la movilidad electroforética es proporcional al grado de disociación, el cual depende del pH del medio. Se ensayaron valores de pH entre 4.5 y 6.5 a intervalos de 0.5 unidades, empleando la disolución reguladora de acetato amónico 50 mM con un 30 % de IPA y ajustando al correspondiente pH mediante la adicción de la cantidad adecuada de ácido acético glacial. El estudio se llevó a cabo inyectando la disolución patrón por presión a 50 mbar durante 10 segundos en todos los casos. Estas disoluciones se ensayaron bajo las condiciones operacionales indicadas en la *Tabla 3.25*.

Los electroferogramas obtenidos en este estudio (*Figura 3.19*) reflejan que a valores de pH superiores a 5.5, la resolución de los compuestos estudiados empeora considerablemente, especialmente para los isómeros 2C₄⁻, 3C₄⁻ y 4C₄⁻SPC que aparecen solapados. Esto se debe al aumento en el grado de disociación de los SPCs al aumentar el pH, lo que se traduce en el aumento de las movilidades electroforéticas de los analitos. A valores de pH inferiores a 5.5 la resolución aumenta a costa de aumentar el tiempo de análisis.

Según lo expuesto, seleccionamos un valor de pH de trabajo de 5.5 como un compromiso entre la resolución de los compuestos estudiados y el tiempo de análisis.

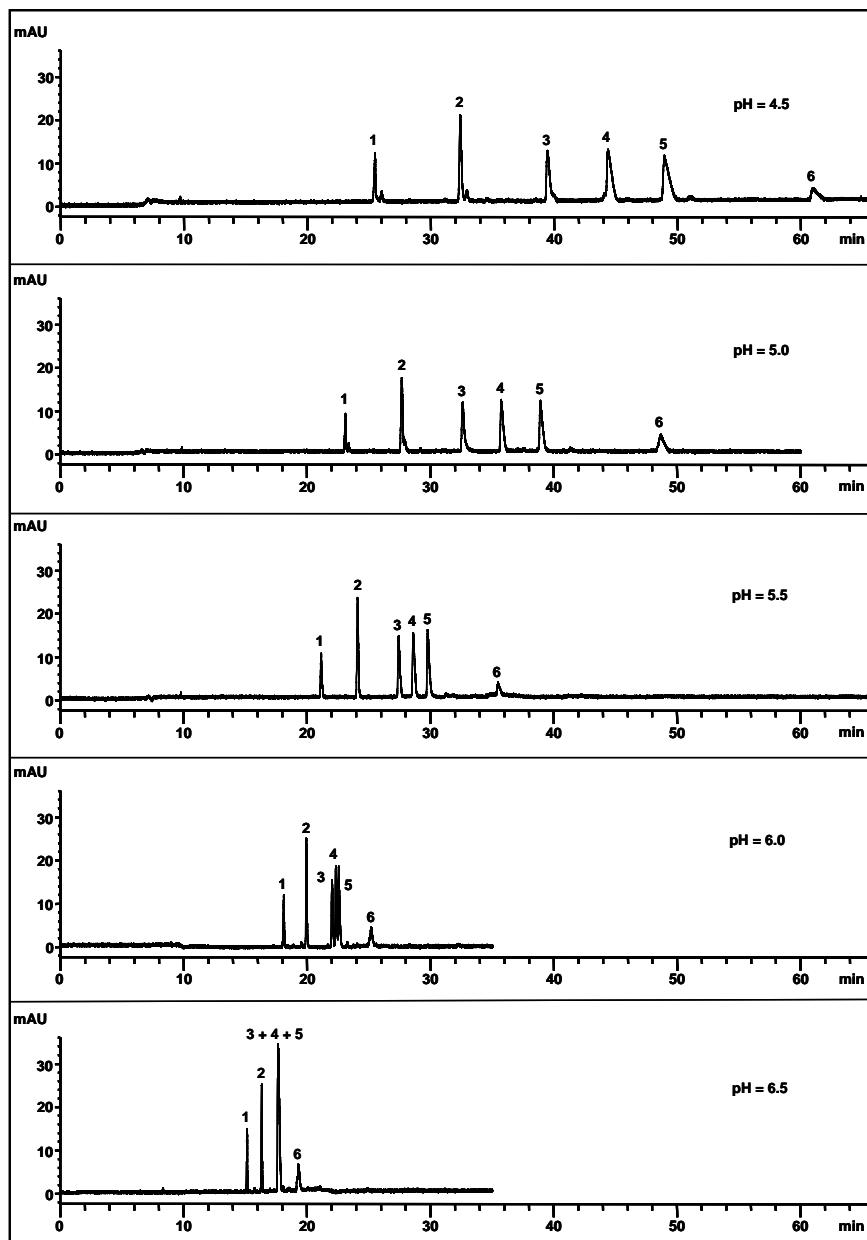


Figura 3.19 - Electroferogramas obtenidos a distintos pH de la disolución electroforética. La identificación de los picos es la de la Figura 3.17.

3.3.2 Influencia de la naturaleza y concentración de la disolución reguladora

Para este estudio se probaron tres disoluciones reguladoras diferentes: ácido acético/acetato amónico; ácido cítrico/citrato sódico y ácido fosfórico/dihidrógeno fosfato sódico, todas ellas a una concentración de 50 mM, a pH 5.5, con un 30 % de IPA y una concentración 1 mM de CTAB. Los patrones se inyectaron con las condiciones operacionales que aparecen en la *Tabla 3.25*. En la *Figura 3.20* se muestran los electroferogramas obtenidos bajo estas condiciones.

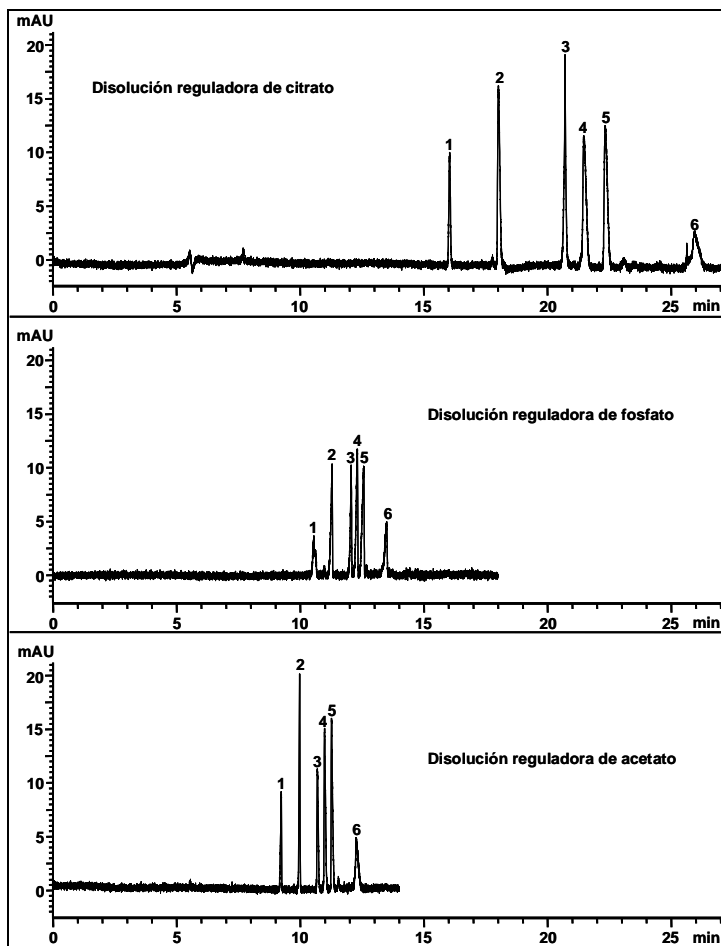


Figura 3.20 - Electroferogramas obtenidos con distintas disoluciones reguladoras. La identificación de los picos es la misma que la de la Figura 3.17.

Se seleccionó la disolución reguladora acetato amónico/ácido acético para los estudios posteriores debido a que con ésta se obtienen picos electroforéticos con mejor morfología analítica y el tiempo de análisis es menor.

La influencia de la concentración de la disolución reguladora acético/acetato amónico se evaluó a cinco niveles de concentración: 25, 50, 75, 100 y 150 mM. En la **Figura 3.21** se observa el aumento de los tiempos de migración al aumentar la concentración debido a la disminución en la movilidad electroforética de los analitos. Se seleccionó una concentración de 25 mM como compromiso entre resolución y tiempo de análisis empleado.

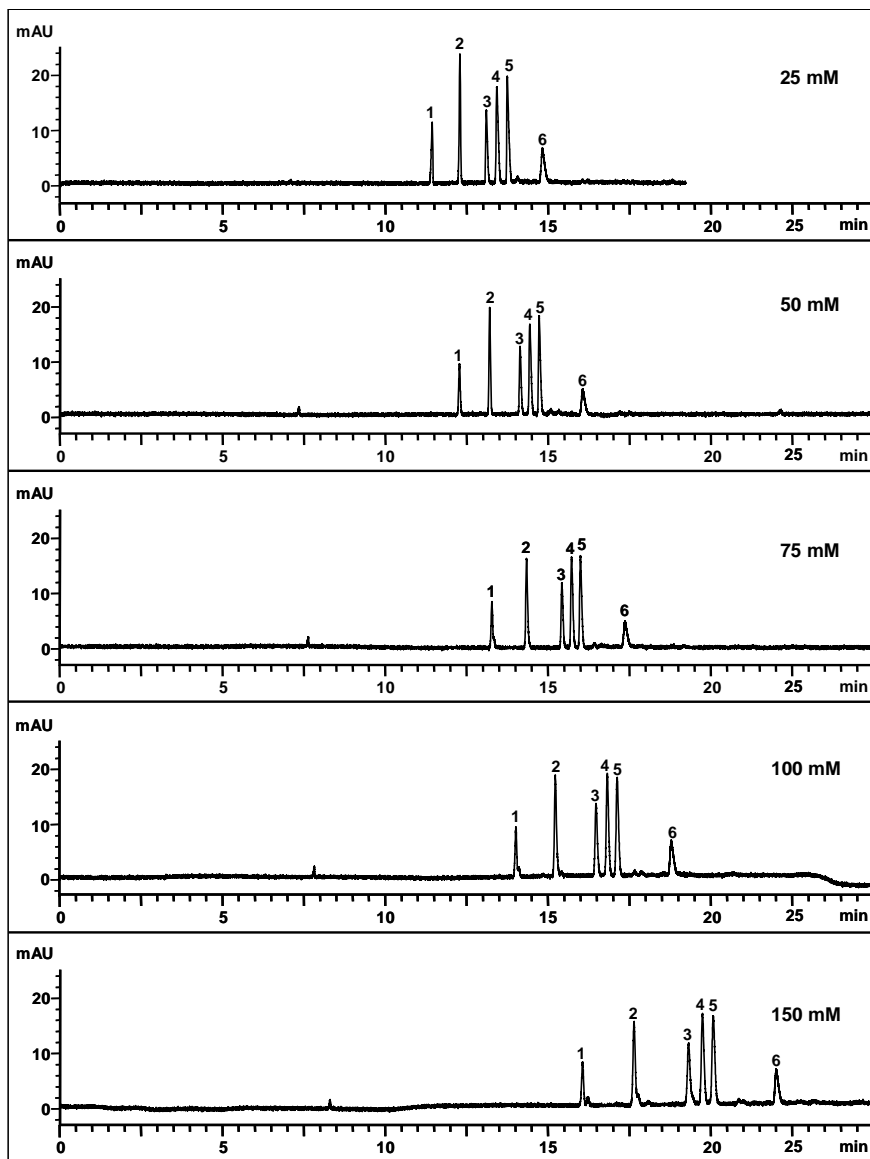


Figura 3.21 - Electroferogramas obtenidos a distintas concentraciones de reguladora acetato amónico (pH 5.5, 30 % IPA, 1 mM CTAB). La identificación de los picos es la de la Figura 3.17.

3.3.3 Influencia de la adición de modificadores orgánicos

La adición de disolventes orgánicos incrementa la viscosidad y disminuye la constante dieléctrica del electrolito, dando lugar a tiempos de migración superiores y modificando la resolución. Los modificadores orgánicos estudiados en una proporción del 30 % (v/v) (empleando la disolución reguladora acético/acetato 25 mM, pH 5.5, 1 mM de CTAB) fueron: acetonitrilo (ACN), metanol (MeOH), tetrahidrofurano (THF), etilenglicol (EG) e isopropanol (IPA). Los patrones se inyectaron con las condiciones operacionales que aparecen en la *Tabla 3.25*.

En la *Figura 3.22* se muestran los electroferogramas obtenidos.

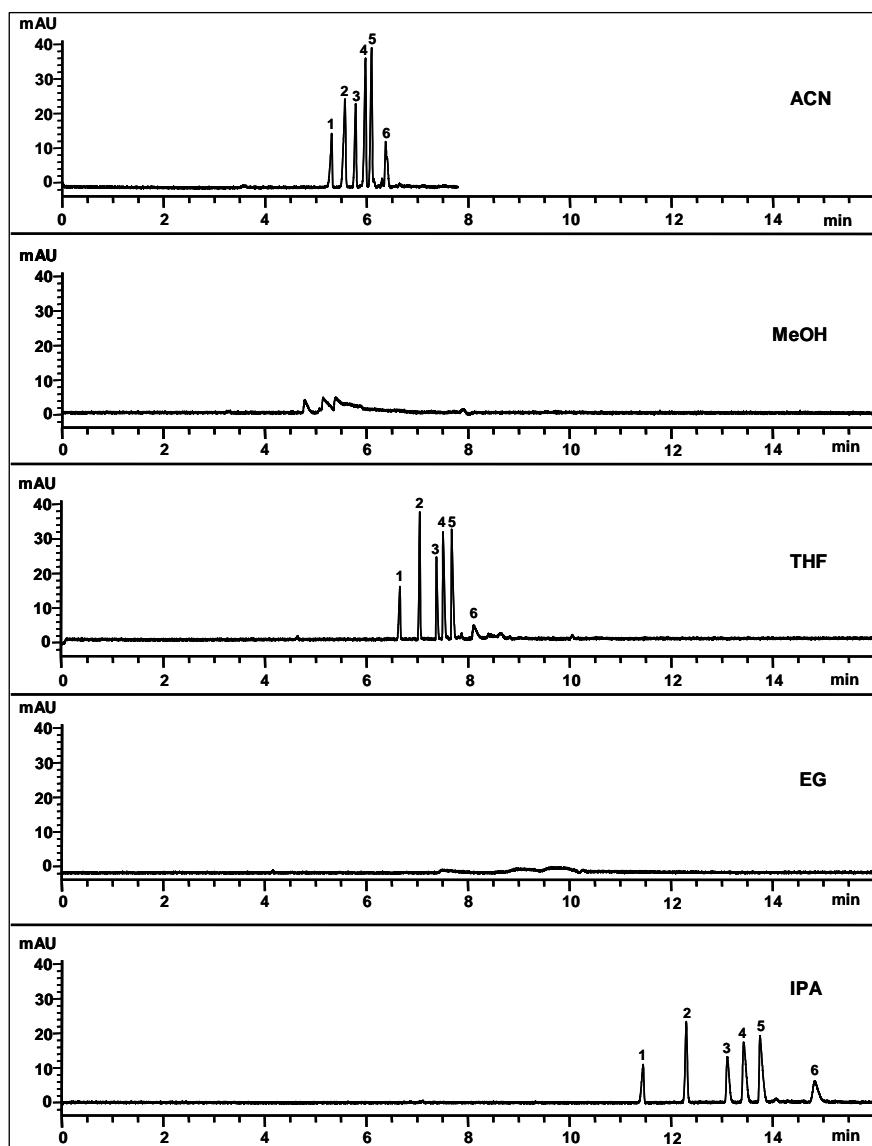


Figura 3.22 - Electroferogramas obtenidos empleando distintos modificadores orgánicos. La identificación de los picos aparece en la Figura 3.17.

Se observan buenos resultados al emplear disolventes orgánicos como el tetrahidrofurano, el acetonitrilo o el isopropanol. Se estudió el efecto de

variar la proporción en el rango de 5 a 35 % en pasos de 5 % para estos tres disolventes (*Figuras 3.23 a 3.25*).

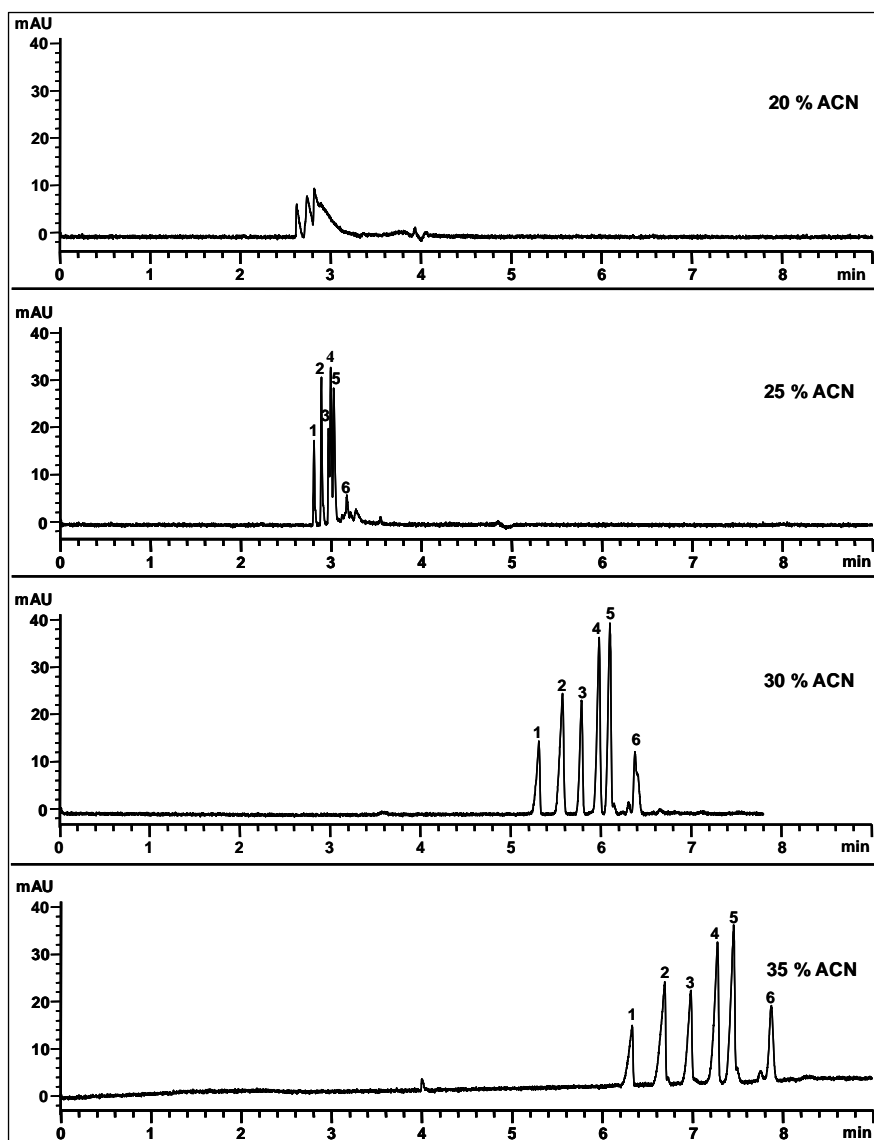


Figura 3.23 - Electroferogramas obtenidos al variar la proporción de ACN en el rango de 5 a 35 %. La identificación de los picos aparece en la Figura 3.17.

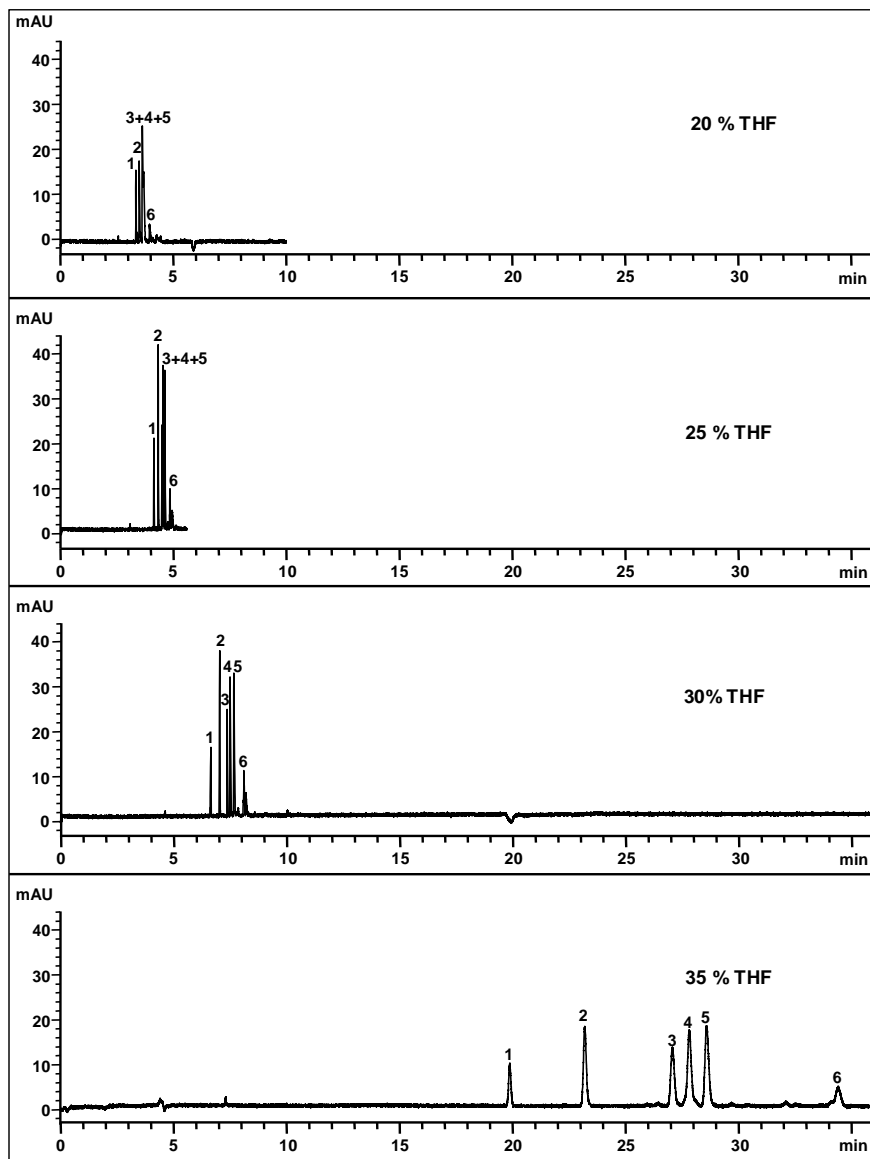


Figura 3.24 - Electroferogramas obtenidos al variar la proporción de THF en el rango de 5 a 35 %. La identificación de los picos aparece en la Figura 3.17.

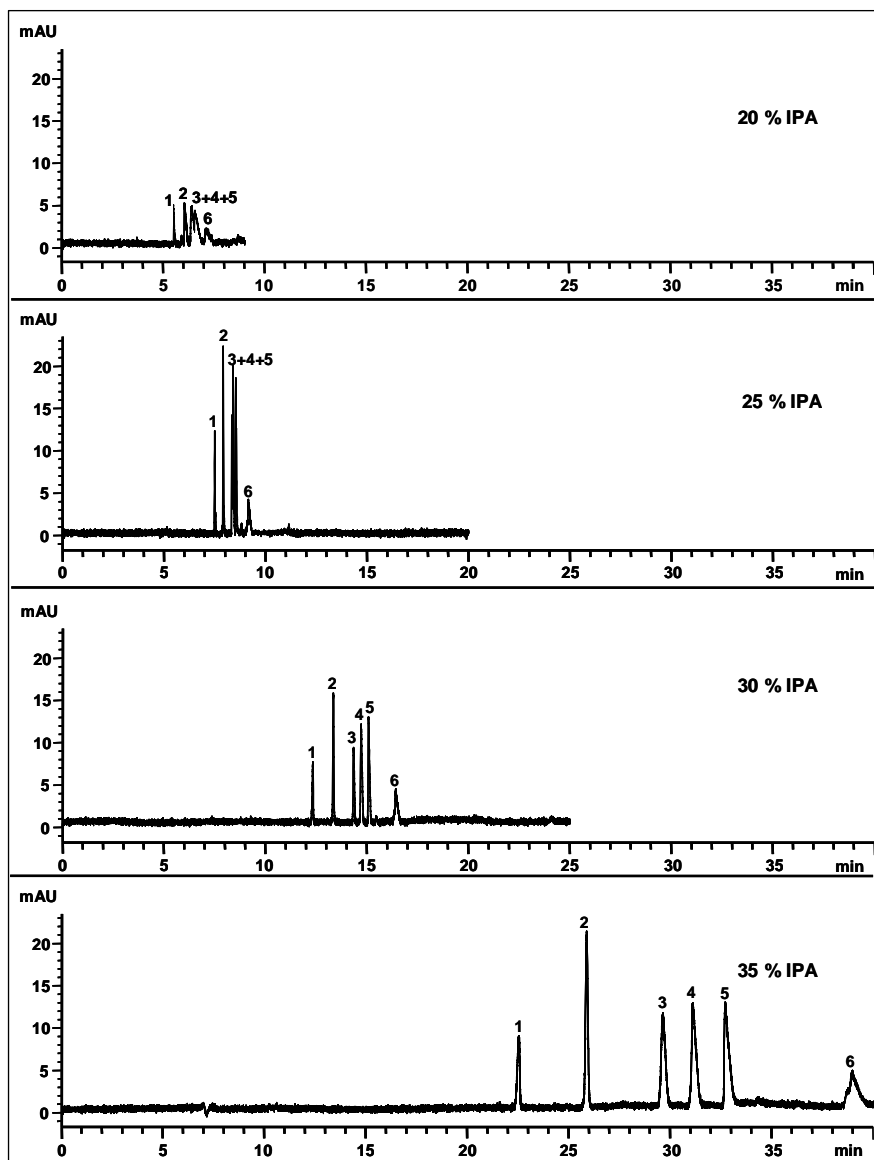


Figura 3.25 - Electroferogramas obtenidos al variar la proporción de IPA en el rango de 5 a 35 %. La identificación de los picos aparece en la Figura 3.17.

Se seleccionó IPA como modificador orgánico en un porcentaje del 30 % por proporcionar picos resueltos con mejor simetría y un menor tiempo de análisis.

3.3.1 Influencia en la concentración de CTAB

La adición de surfactantes a la disolución electroforética es una modificación frecuente para conseguir optimizar el FEO y el proceso de separación.

Se estudió el efecto que ejerce la concentración de CTAB sobre la separación electroforética, siendo los valores ensayados: 0.5, 1.0, 2.5 y 5.0 mM y empleando la disolución de acético/acetato amónico 25 mM a pH 5.5, con 30 % v/v de IPA en las condiciones operacionales que aparecen en la **Tabla 3.25**.

Debido a la alta proporción de disolvente orgánico empleado en la disolución reguladora, el CTAB no forma micelas aunque se emplee en concentraciones superiores a su concentración micelar crítica (CMC). Los electroferogramas obtenidos se recogen en la **Figura 3.26**.

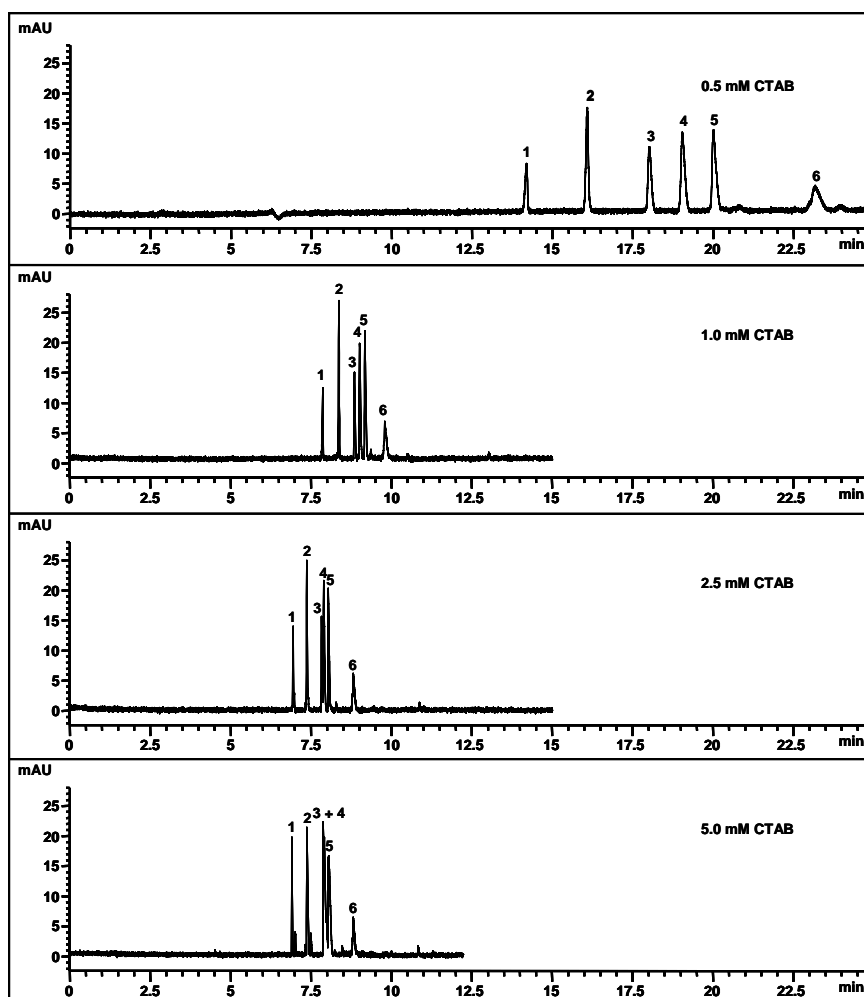


Figura 3.26 - Electroferogramas a distintas concentraciones de CTAB empleando la disolución de acético/acetato amónico/ácido acético (25 mM, pH 5.5), 30 % v/v IPA. La identificación de los picos aparece en la Figura 3.17.

Se observa que empleando concentraciones superiores a 1.0 mM los picos correspondientes a los tres isómeros butíricos no se resuelven de forma adecuada. Por tanto, se escogió una concentración 1.0 mM de CTAB como el mejor compromiso entre la resolución de todos los compuestos y el tiempo de análisis.

3.3.2 Influencia del voltaje

Este parámetro afecta en alto grado a la velocidad y calidad de las separaciones en electroforesis capilar. En general, un aumento en el voltaje, produce un aumento del flujo electroosmótico, lo que origina una reducción en los tiempos de migración, y por tanto del tiempo de análisis, y puede originar un estrechamiento de los picos y una mejora de la resolución. Sin embargo, no siempre pueden utilizarse voltajes muy altos, ya que pueden dar lugar a corrientes altas y a un aumento del efecto Joule o producción excesiva de calor dentro del capilar, que genera pérdida en la resolución y eficacia de los picos, tiempos de migración no reproducibles, descomposición o desnaturalización de las muestras, etc. Teniendo en cuenta las ventajas e inconvenientes, lo deseable es trabajar al máximo voltaje donde el calor que se genera pueda ser disipado.

Para seleccionar el voltaje óptimo se registraron electroferogramas aplicando voltajes entre - 15 y - 30 kV a intervalos de -5 kV, usando la disolución de acético/acetato (25 mM, pH 5.5, 30 % v/v IPA, 1 mM CTAB) y las condiciones operacionales que aparecen en la **Tabla 3.25**. En la figura **Figura 3.27** se muestran los resultados obtenidos.

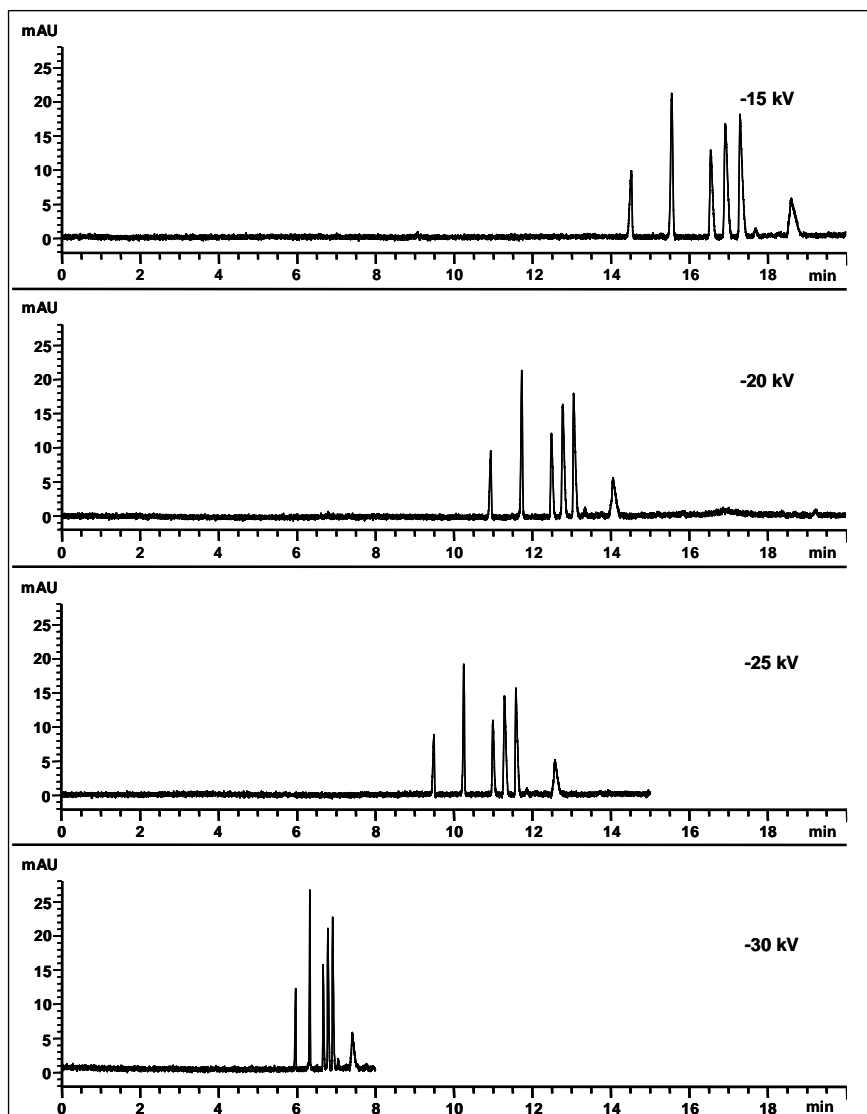


Figura 3.27 - Electroferogramas registrados a distintos voltajes, empleando la disolución acético/acetato amónico (25 mM, pH 5.5) con 30 % v/v de IPA y 1 mM de CTAB. La identificación de los picos aparece en la Figura 3.17.

Como se observa en la *Figura 3.27*, cuando se aplican un voltaje de - 30 kV se obtienen picos más estrechos y un tiempo de análisis menor, sin

embargo, los tiempos de migración no son reproducibles. Por ello se eligió un voltaje de - 25 kV como voltaje de trabajo ya que con este valor sí se lograba mantener la reproducibilidad de los tiempos de migración.

3.3.3 Influencia de la temperatura

El control de la temperatura en electroforesis capilar es de gran importancia, ya que pequeños cambios pueden provocar variaciones en el valor del pH, viscosidad, volumen de muestra inyectada, flujo electroosmótico, corriente, fuerza iónica y movilidad electroforética, que repercuten en la calidad de la separación y en la repetibilidad del sistema.

Una buena selección de la temperatura de trabajo asegura, en parte, obtener resultados reproducibles en tiempo de migración y área de pico, además de permitir generar sólo la cantidad de calor que se pueda disipar a través del capilar de sílice fundida para minimizar el efecto Joule.

Se estudió el efecto de la temperatura en el rango comprendido entre 20 y 30 °C empleando la disolución electroforética acético/acetato amónico 25 mM, pH 5.5, 30 % v/v IPA, 1 mM CTAB y las condiciones operacionales mostradas en la **Tabla 3.25**. En la **Figura 3.28** se muestran los resultados obtenidos.

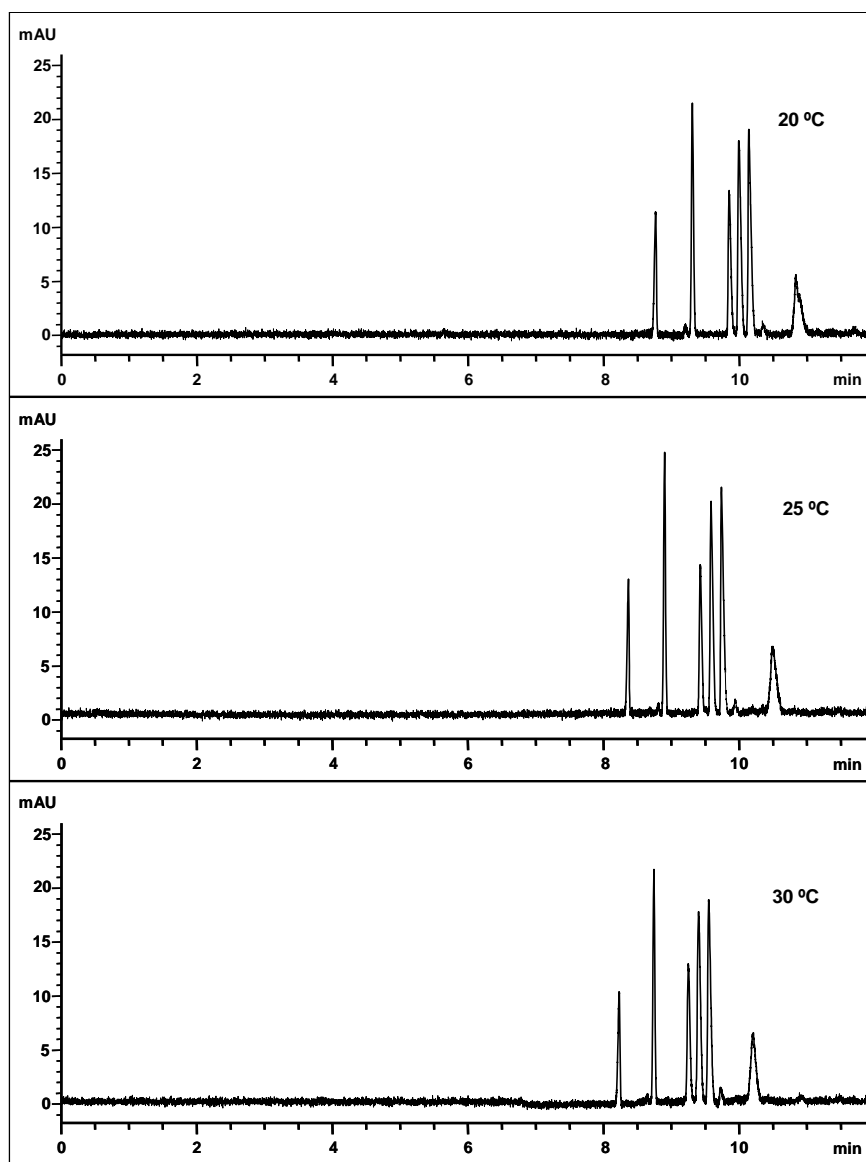


Figura 3.28 - Electroferogramas registrados a distintas temperaturas empleando la disolución acético/acetato amónico (25 mM, pH 5.5) con 30 % (v/v) de IPA y 1 mM de CTAB. La identificación de los picos aparece en la Figura 3.17.

Aunque a 30 °C se obtienen tiempos de análisis algo menores, no hay reproducibilidad en los tiempo de migración, motivo por el cual la temperatura seleccionada fue 25 °C.

3.4 Procedimientos de preconcentración

El inconveniente más importante al usar el sistema de detección DAD es el pequeño paso de luz (diámetro habitual del capilar entre 50-100 μm) y el bajo volumen de muestra introducido, por lo que se reduce de forma notable la sensibilidad. Este problema de sensibilidad puede ser fácilmente resuelto mediante el empleo de técnicas de preconcentración, tanto “*off-line*” como “*on-line*”.

A continuación se describe las técnicas de preconcentración empleadas para aumentar la sensibilidad del método optimizado.

3.4.1 Preconcentración on-line

Para aumentar la sensibilidad se empleó la técnica de preconcentración por acumulación o *stacking* en modo normal (NSM). Esta técnica consiste en la inyección hidrodinámica de una gran cantidad de muestra con una conductividad eléctrica menor que la disolución de separación. En este modo de trabajo la focalización ocurre en la interfaz entre la matriz de baja conductividad y la disolución de separación de mayor conductividad, debido al cambio brusco del campo eléctrico local y como consecuencia, en la movilidad electroforética de los analitos.

Se estudió el fenómeno de preconcentración NSM a tres tiempos distintos 60, 100 y 150 segundos, verificándose que al usar tiempos de inyección superiores a 100 segundos aparecían picos solapados además de aumentar el tiempo de análisis debido a la gran cantidad de muestra introducida. Por este motivo se seleccionó 100 segundos como tiempo de inyección.

No obstante, hubo que introducir una pequeña modificación en el método electroforético desarrollado ya que los picos correspondientes a los tres isómeros sulfonilbutíricos no aparecían totalmente resueltos, como consecuencia del ensanchamiento de pico producido al introducir mayor cantidad de muestra. La opción más simple fue introducir un cambio en la concentración del modificador del FEO. Se probaron dos concentraciones inferiores a la utilizada hasta ahora (1 mM) con el fin de mejorar la resolución. Las concentraciones probadas fueron 0.75 y 0.5 mM de CTAB, seleccionando el valor de 0.75 mM como el mejor compromiso entre la resolución de todos los compuestos y el tiempo de análisis.

3.4.2 Preconcentración off-line.

Para mejorar los límites de detección y cuantificación del método electroforético desarrollado se llevó a cabo una preconcentración off-line mediante extracción en fase sólida (SPE).

Las condiciones de partida del procedimiento de SPE que se recogen en la **Tabla 3.18**, fueron las optimizadas en el **apartado 2.2** del presente capítulo.

Tabla 3.18 - Condiciones iniciales del procedimiento SPE previo a la determinación de SPCs mediante CE-DAD.

Etapa	Reactivos/condiciones
1) Acondicionamiento	6 mL MeOH + 6 mL disolución reguladora de fosfato (50 mM, pH = 1.5)
2) Carga	10 mL carga acuosa tamponada
3) Elución	3 mL MeOH:DCM (9:1)

El eluato obtenido en el procedimiento de SPE se lleva a sequedad bajo corriente de nitrógeno y se reconstituye en 1 mL de agua Milli-Q y el extracto resultante es el que se inyecta en el sistema de CE.

Con estas condiciones iniciales, los picos correspondientes a los SPCs estudiados aparecen totalmente distorsionados. Esto podría deberse a que la diferencia entre la conductividad de la muestra y la de la disolución electroforética empleada para llevar a cabo la separación no es suficiente, debido probablemente a la alta concentración de disolución reguladora que debe emplearse para mantener el pH de la muestra a un valor de 1.5. Por este motivo, se estudió el efecto de acidificar la muestra en lugar de tamponarla.

Los ácidos empleados para llevar a cabo este estudio fueron: ácido clorhídrico, ácido perclórico, ácido ortofosfórico y ácido fórmico y el intervalo de pH estudiado está comprendido entre 1.5 y 3.5 a intervalos de 0.5. Se seleccionó ácido perclórico a pH 1.5, ya que con estas condiciones se obtenía los picos electroforéticos con la mejor morfología.

En la **Tabla 3.26** se recogen las condiciones de trabajo finales del procedimiento de SPE para la determinación de SPCs mediante CE-DAD.

Tabla 3.26 - Condiciones de trabajo del procedimiento SPE previo a la determinación de SPCs mediante CE-DAD.

Etapa	Reactivos/condiciones
1) Acondicionamiento	6 mL MeOH + 6mL disolución reguladora de fosfato (50 mM, pH = 1.5)
2) Carga	10 mL carga acuosa acidificada a pH 1.5 con ácido perclórico
3) Elución	3 mL MeOH:DCM (9:1, v/v)

A continuación, en la **Figura 3.29** se muestra un electroferograma de un patrón conteniendo $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cada SPC y $20 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de patrón interno, al que se le ha aplicado las preconcentraciones “on-line” y “off-line” desarrolladas.

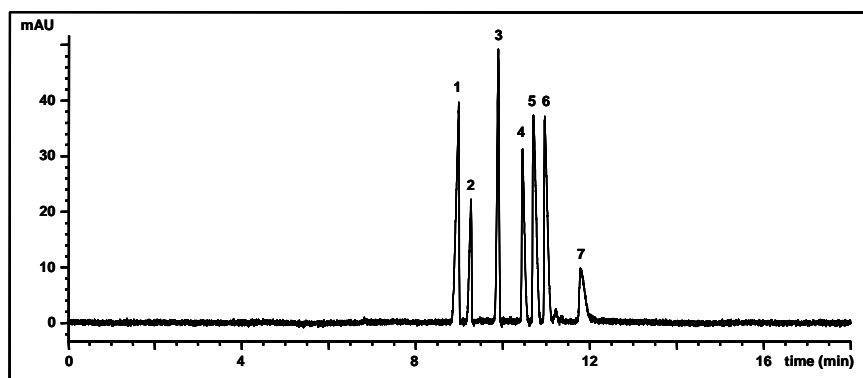


Figura 3.29 - Electroferograma registrado llevando a cabo los procedimientos de preconcentración “on-line” y “off-line”. Identificación de picos: (1) ácido p-bencenosulfónico; (2) ácido (p-sulfofenil)acético; (3) ácido 2-(p-sulfofenil)propiónico; (4) ácido 2-(p-sulfofenil)butírico; (5) ácido 3-(p-sulfofenil)butírico; (6) ácido 4-(p-sulfofenil)butírico; (7) ácido 5-(p-sulfofenil)valeriánico.

3.5 Resumen de las condiciones óptimas de trabajo

En la *Tabla 3.27* se muestran los valores experimentales seleccionados como óptimos para la determinación simultánea de seis ácidos sulfofenilcarboxílicos mediante electroforesis capilar empleando stacking en modo normal como técnica de preconcentración “on-line”.

Tabla 3.27 - Condiciones óptimas para la determinación de los seis ácidos sulfofenilcarboxílicos mediante electroforesis capilar empleando la técnica de preconcentración on-line NSM.

Condiciones electroforéticas	
Capilar	Diámetro interno: 75 μm Longitud efectiva: 50 cm
Disol. reguladora	Acetato amónico (25 mM, pH 5.5)
Modificador orgánico	IPA, 30 % v/v
Surfactante	CTAB, 0.75 mM
Polaridad	Negativa
Voltaje	- 25 kV
Temperatura	25 $^{\circ}\text{C}$
Inyección	Presión, 50 mbar, 100 s
λ DAD	225 nm

3.6 Parámetros analíticos del método electroforético

A continuación se comentan los parámetros analíticos conseguidos tras la obtención de los datos experimentales.

3.6.1 - Establecimiento y verificación del modelo

El modelo de calibración seleccionado fue el linear de regresión univariante por mínimos cuadrados. Como patrón interno se usó el ácido *p*-sulfobenzoico, construyendo las correspondientes curvas de calibración usando el cociente área analito/área patrón interno, frente a concentración de analito.

Para establecer las funciones de calibrado se siguió el procedimiento que se describe a continuación. En una serie de matraces aforados de 100 mL de capacidad, se prepararon concentraciones crecientes de los patrones (10.0, 20.0, 30.0, 50.0, 100.0 y 200.0 ng·mL⁻¹). Se evaporó en rotavapor hasta reducir el volumen por debajo de 10 mL, se trasvasó a un matraz de 10 mL, se acidificó con ácido perclórico hasta pH 1.5 y se adicionó agua milli-Q hasta un volumen final de 10 mL. Finalmente se llevó a cabo el procedimiento de extracción mediante SPE descrito en el apartado anterior.

Se realizaron 3 réplicas experimentales y 2 réplicas instrumentales para cada nivel de concentración. Los parámetros estadísticos calculados para el método de determinación SPCs son los que se muestran en la **Tabla 3.28**.

Tabla 3.28 - Parámetros estadísticos para la determinación de SPCs mediante CE-DAD.

SPC	b (mL·ng ⁻¹)	S _b	a	S _a	R ² (%)	S _{y/x}	P _{lof} (%)
C ₂	0.0043	0.0001	0.0122	0.0017	99.96	0.0066	25.3
2C ₃	0.0087	0.0001	-0.0013	0.0033	99.96	0.0130	28.7
2C ₄	0.0068	0.0001	0.0089	0.0035	99.92	0.0136	36.1
3C ₄	0.0101	0.0001	0.0026	0.0068	99.87	0.0169	45.8
4C ₄	0.0097	0.0001	0.0060	0.0039	99.96	0.0153	23.5
5C ₅	0.0052	0.0001	-0.0036	0.0037	99.91	0.0116	38.0

Para la verificación del modelo, se realizaron los siguientes estudios:

1) Evaluación del *fallo de ajuste* (P_{Loj}), para determinar la tendencia lineal de los datos. Como se observa en la **Tabla 3.28**, en todos los casos el valor P del test resultaron ser mayores del 15%, concluyéndose por tanto que no existe curvatura, y que los datos se ajustan a un modelo lineal.

2) Evaluación de la condición de *homocedasticidad*, es decir, homogeneidad de varianzas. Con esta finalidad se empleó el análisis visual de los gráficos de los residuos. Mediante este análisis, se observó que se cumplían las premisas fijadas en todos los casos. Por tanto, se puede afirmar que los datos son homocedásticos.

3.6.2 - Parámetro de calidad del método analítico

3.6.2.1 - Límite de detección y cuantificación

Para el cálculo de estos parámetros se utilizó la metodología basada en la recta de calibrado, descrita en el apartado 5.3.4 del **Capítulo Experimental: Materiales y Métodos** (opción b).

Los resultados se presentan en la **Tabla 3.29**.

Tabla 3.29 - Límites de detección y cuantificación para la determinación de SPCs mediante CE-DAD.

SPC	LD (ng·mL ⁻¹)	LQ (ng·mL ⁻¹)
C ₂	1	4
2C ₃	1	4
2C ₄	2	6
3C ₄	1	5
4C ₄	1	5
5C ₅	2	6

3.6.2.2 Rango dinámico lineal y Linealidad

En la **Tabla 3.30** se muestran los valores obtenidos para el Rango Dinámico Lineal (RDL), la linealidad (LIN), la Desviación Estándar Relativa (DER) y la sensibilidad analítica (S_{analítica}).

Tabla 3.30 - RDL, LIN on line, DER y $S_{analítica}$ para la determinación de SPCs mediante CE-DAD.

SPC	RDL (ng·mL ⁻¹)	LIN (%)	DER (%)	$S_{analítica}$ (μg·L ⁻¹)
C ₂	4-200	98.61	1.39	1.53
2C ₃	4-200	98.70	1.30	1.49
2C ₄	6-200	98.07	1.93	2.00
3C ₄	5-200	98.67	1.33	1.67
4C ₄	6-200	98.63	1.37	1.58
5C ₅	6-200	97.84	2.16	2.23

En todos los casos la linealidad es superior al 95%. Por tanto, se puede afirmar que los datos experimentales se ajustan al modelo lineal propuesto.

3.6.2.3 Precisión

Con el fin de evaluar la precisión del método, se estimó la repetibilidad *intra-* e *interdía*. Para ello se fortificaron muestras de blanco de agua a tres niveles de concentración de cada SPC (50, 100 y 150 ng·mL⁻¹), llevando a cabo 6 análisis (3 réplicas experimentales y 2 réplicas instrumentales) de cada concentración cada uno de los 3 días del estudio. Las disoluciones fueron tratadas mediante el procedimiento ya descrito con anterioridad e introducidas en el equipo de electroforesis capilar fijando las condiciones instrumentales habituales. Los valores de recuperación fueron calculados comparando los resultados analíticos de las muestras extraídas, con patrones a los que no se les aplicó el

procedimiento de extracción y que representaban el 100 % de recuperación. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 3.31**.

Tabla 3.31 - Recuperaciones (%) intra e interdía y precisión (RSD, %)*.

	Nivel de concentración (ng·L ⁻¹)			
	Día	50	100	150
C₂	1	61 (2)	63 (2)	62 (2)
	2	62 (2)	61 (2)	63 (1)
	3	63 (1)	64 (2)	61 (2)
2C₃	1	75 (1)	72 (2)	74 (2)
	2	73 (2)	75 (2)	77 (1)
	3	76 (1)	74 (2)	76 (2)
2C₄	1	94 (2)	96 (2)	93 (2)
	2	95 (1)	92 (2)	91 (2)
	3	92 (2)	94 (1)	92 (2)
3C₄	1	80 (1)	84 (2)	81 (2)
	2	83 (2)	85 (2)	82 (1)
	3	82 (2)	81 (2)	84 (2)
4C₄	1	78 (2)	74 (2)	75 (2)
	2	75 (1)	76 (2)	74 (2)
	3	77 (2)	78 (1)	77 (2)
5C₅	1	87 (1)	89 (2)	86 (2)
	2	85 (1)	86 (2)	88 (2)
	3	88 (2)	86 (2)	85 (2)

* Media de seis determinaciones. RSD (%), desviación estándar relativa.

Se observa que, en todos los casos, la desviación estándar relativa es menor del 10 % y se puede concluir que el método propuesto ofrece resultados próximos entre sí y por tanto, es preciso.

3.6.2.4 Sensibilidad o Resolución analítica

De acuerdo con los datos experimentales obtenidos, las resoluciones analíticas calculadas para cada componente se expresan en la **Tabla 3.30**.

3.7 Validación del método electroforético desarrollado

La validación de la metodología propuesta para la determinación de SPCs mediante electroforesis capilar con detección UV se llevó a cabo usando agua de pozo, procedente de la zona no saturada de una parcela agrícola de la Vega de Granada, situada a 5 Km de esta ciudad. Previamente se confirmó usando el método propuesto por Del Olmo y colaboradores¹, que los niveles de LAS en este agua no eran significativos.

Las muestras para llevar a cabo la validación se prepararon usando 100 mL de agua de pozo, fortificada en los mismos niveles de concentración que los que se emplearon para el calibrado y tratando las muestras como los estándares de calibrado siguiendo todo el procedimiento analítico descrito con anterioridad. En primer lugar se evaluó el “efecto matriz” mediante comparación estadística de las pendientes y ordenadas en el

¹ Del Olmo M., Garballo A., Nimer M., López I., De Ferrer J.A., Vilchez J.L., *Development of methodologies for different degrees of resolution of Linear Alkylbenzene Sulfonates in groundwater and wastewater by Liquid Chromatography using sodium dodecyl sulphate*. *Chromatographia* 60; 157-164, 2004.

origen obtenidas en ambos calibrados. Los resultados obtenidos demostraron que no existían diferencias estadísticas significativas entre las pendientes y las ordenadas en el origen de ambos.

A continuación, la validación del método para estas muestras de agua se llevó a cabo usando el test de recuperación de **t-Student**. Los resultados obtenidos se presentan a en la **Tabla 3.32**.

Tabla 3.32 - Veracidad del método. Determinaciones a diferentes niveles de concentración de cada SPC, medidas en 3 días (n=15 para cada día).

SPC	Veracidad				
	Conc. añadida (ng·mL ⁻¹)	Conc. encontrada (ng·mL ⁻¹)	Rec. (%)	t _{calc.}	P (%)
C ₂	10	9.9 ± 0.2	99	1.12	31
	20	20.2 ± 0.3	101	1.46	20
	40	39.8 ± 0.4	99	1.47	20
	80	80.5 ± 1.1	101	1.03	35
	160	160.5 ± 2.2	100	0.45	33
2C ₃	10	10.1 ± 0.1	101	1.17	30
	20	19.9 ± 0.4	100	0.54	68
	40	40.1 ± 0.5	100	0.76	48
	80	79.6 ± 0.6	100	0.43	21
	160	161.1 ± 2.9	101	0.97	34
2C ₄	10	9.9 ± 0.1	99	1.94	11
	20	19.9 ± 0.3	99	1.28	26
	40	40.1 ± 0.2	100	0.71	51
	80	79.7 ± 1.9	100	0.34	75
	160	161.4 ± 2.5	101	1.39	22
3C ₄	10	10.1 ± 0.1	101	0.94	39
	20	20.1 ± 0.2	100	0.62	57
	40	40.4 ± 0.4	101	1.99	10
	80	79.4 ± 1.2	99	1.25	27
	160	159.3 ± 1.0	100	1.74	14
4C ₄	10	10.0 ± 0.1	100	1.52	19
	20	20.0 ± 0.4	100	0.32	76
	40	40.1 ± 0.5	100	0.76	48
	80	80.4 ± 0.8	101	1.17	30
	160	160.9 ± 1.6	101	1.36	23
5C ₅	10	10.0 ± 0.1	101	1.03	35
	20	20.1 ± 0.2	100	1.04	34
	40	39.8 ± 0.4	100	1.33	24
	80	80.2 ± 0.7	100	0.55	60
	160	158.7 ± 1.9	99	1.69	15

A los datos obtenidos se les aplicó el test de comparación de una media experimental con un valor conocido. Los valores de t_{calc} fueron en todos los casos inferiores a los valores de t_{tab} , resultando en la aceptación de la hipótesis nula (no hay diferencia significativas entre las concentraciones encontradas y las añadidas) y demostrándose con esto que el método desarrollado produce resultados veraces.

Se puede afirmar por tanto que el método propuesto es exacto para todos los analitos con un nivel de significación mayor del 5%.

4.- APLICACIÓN DE LA METODOLOGÍA DESARROLLADA

Los métodos analíticos desarrollados a lo largo del trabajo experimental se aplicaron para llevar a cabo un estudio de campo consistente en evaluar la biodegradación del tensioactivo LAS en suelo agrícola a partir de la determinación de SPCs en las aguas de riego lixiviadas. Para ello, fue necesario realizar estudios previos de la posible adsorción de los SPCs en suelo, poner a punto metodología para la captación del agua lixiviada y llevar a cabo los oportunos experimentos preliminares para caracterizar química y físicamente las matrices (suelo agrícola y agua de pozo).

4.1 - Estudio previo de adsorción de SPCs en columna

Para comprobar la capacidad de adsorción de los SPCs en el suelo, se realizaron varios ensayos previos de adsorción en columna. Se eligió este procedimiento debido a que proporciona una buena representación del transporte de los solutos en condiciones de campo¹.

En la **Tabla 3.33** se recogen las características de la columna usada en los ensayos previos de adsorción.

¹ Griffioen J., Appelo C.A.J., Van Veldhuizen M., *Practice of chromatography. Deriving isotherms from elution curves*. Soil Sci, Soc. Am. J. 56; 1429-1437; 1992

Tabla 3.33 - Características de la columna utilizada en los ensayos de adsorción.

Características de la columna utilizada	Lecho Saturado
Diámetro interno (mm)	23.8
Altura de la columna (mm)	103
Volumen de poros (mL)	9.88
Peso de suelo (g)	60.55
Velocidad del efluente ($\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}$)	14
Volumen de las fracciones (mL)	10
Nº de fracciones colectadas	100

En la **Figura 3.30** se muestra el aspecto de la columna antes de comenzar las experiencias.



Figura 3.30 - Columna para ensayos de adsorción.

La instalación experimental utilizada constaba de una bomba peristáltica *ISMATEC ISM 834 A*, ajustable a caudales de 1 a 20 mL·h⁻¹. La salida de la bomba se conectó con la parte inferior de la columna, trabajando por tanto, con un flujo en sentido ascendente.

La disolución se situó en un recipiente donde se encontraba sumergido el tubo de succión de la entrada de la bomba. Las muestras se recogieron a intervalos regulares de tiempo, con la ayuda de un colector automático que se programó previamente, y se almacenaron en unos tubos etiquetados, para proceder posteriormente a su análisis.

De cada uno de estos tubos se recogió una fracción de 0.9 mL en un vial de 2 mL, que fue diluida con 0.1 mL de patrón interno (ácido p-sulfobenzoico, 500 mg·L⁻¹) y se analizó mediante LC-FD. Como referencia, se preparó de igual forma un vial de la disolución inicial y se analizó junto con las fracciones efluentes.

En la **Figura 3.31** se representa un esquema de la instalación de los aparatos necesarios para efectuar esta experiencia y en la **Figura 3.32** el aspecto del montaje utilizado.

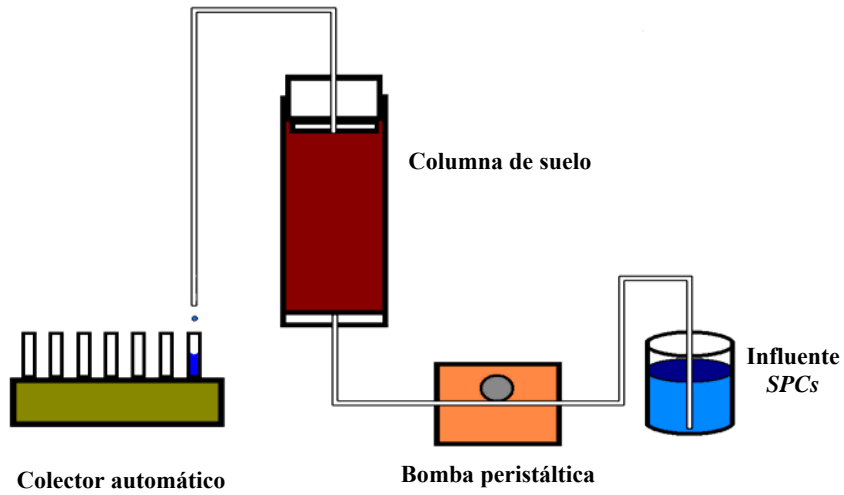


Figura 3.310 - Montaje utilizado para la realización de las experiencias en columna.



Figura 3.32 - Vista del montaje utilizado para la realización de las experiencias en columna.

Se llevaron a cabo tres pruebas, empleando tres influentes distintos: a) una disolución acuosa de 4C₄-SPC de concentración 10 µg·mL⁻¹ b) una

disolución acuosa de los seis SPCs estudiados de concentración $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cada uno de ellos y c) una disolución acuosa de los seis SPCs estudiados de concentración $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cada uno de ellos. Mediante estas tres pruebas se pretendía descartar que hubiera influencia en la adsorción de unos analitos por parte de otros y verificar si el valor de concentración podía afectar a los resultados obtenidos.

Como cabía esperar debido a la alta polaridad de los SPCs, los resultados obtenidos verificaron que no existía adsorción de estos analitos en la columna de tierra, obteniendo un perfil plano al representar la señal analítica (relación área analito/área patrón interno) frente al volumen de efluente.

A modo de ejemplo en la **Figura 3.33** se muestra el perfil de la disolución efluente de 4C₄-SPC.

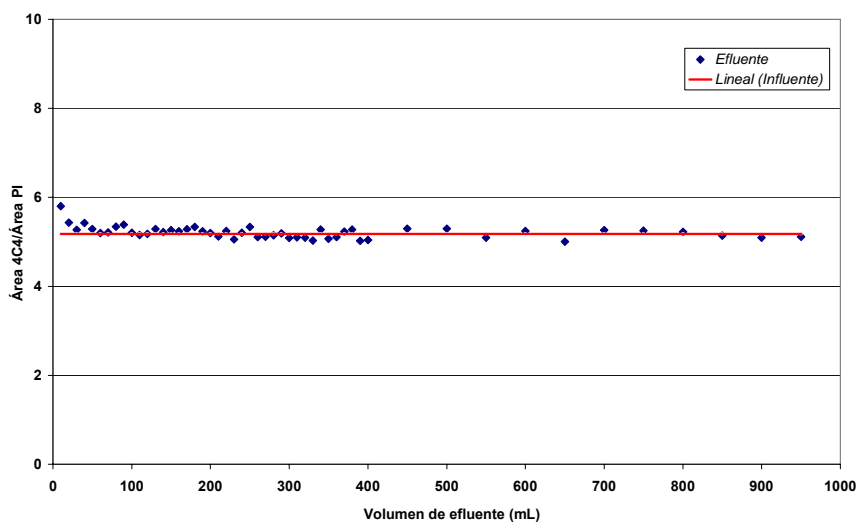


Figura 3.33 - Representación de la señal analítica (área/área PI) en función del volumen de efluente consumido para el 4C₄-SPC.

Este estudio previo fue básico y determinante ya que permitió verificar que los SPCs estudiados no son absorbidos en el suelo, por lo que cabe esperar que aparezcan en el agua lixiviada cuando se biodegrada el LAS.

4.2 - Caracterización del suelo y agua empleados en el estudio

4.2.1 - Estudio del suelo

La aplicación se llevó a cabo en suelo de la Huerta Santa María, situada en el municipio de Belicena (Vega de Granada) a 5 Km de la capital y de coordenadas $37^{\circ} 11' 09,50''$ N; $3^{\circ} 41' 39,85''$ O (*Figura 3.34*). La muestra de suelo se tomó en el horizonte correspondiente a los primeros 25 cm de profundidad.

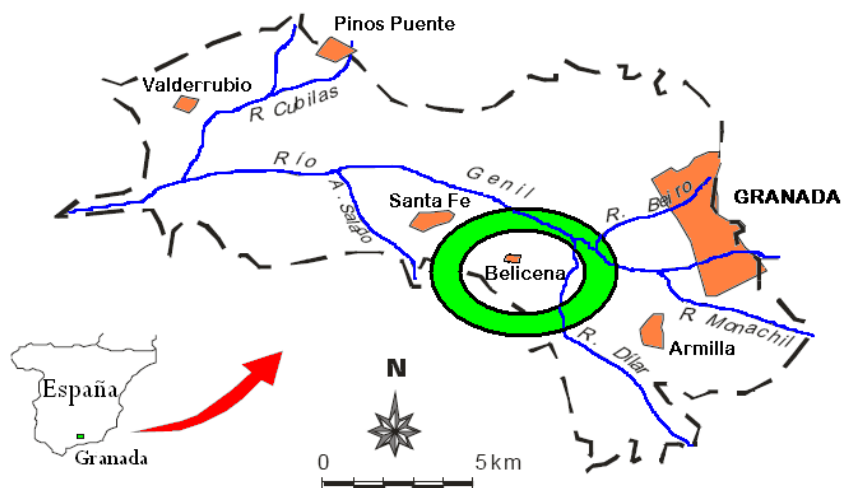


Figura 3.34 - Situación geográfica del suelo donde se llevó a cabo la aplicación.

Una vez en el laboratorio, el suelo se secó al aire, posteriormente se trituró y se pasó por un tamiz de 2 mm de malla. Los elementos gruesos superiores a este tamaño (grava) se lavaron con agua, se dejaron secar a temperatura ambiente y finalmente se pesaron. Todas las pruebas que se indican a continuación se llevaron a cabo en el Instituto del Agua de la Universidad de Granada.

4.2.1.1 Propiedades físicas del suelo

A) Textura

El análisis granulométrico, de acuerdo con el método de Robinson² (1922), requiere, como paso previo, lograr la individualidad de las partículas elementales. Para conseguirlo, es necesario llevar a cabo las siguientes tareas:

- ⇒ Destrucción de agentes cementantes: Dado que la materia orgánica es el principal agente cementante, es necesaria su destrucción para individualizar las partículas minerales, lo que se consigue mediante su oxidación con peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

- ⇒ Dispersión de la muestra: Ésta se lleva a cabo combinando métodos mecánicos (agitación) y métodos químicos, usando como dispersante hexametáfosfato sódico al 10%.

² Robinson G.W., *A new method for mechanical analysis of soil and other dispersion*. J. Agr. Ac. 12; 306-321, 1922

⇒ Clasificación de fracciones: Una vez dispersas las partículas, se procede a su separación en función del tamaño. Para ello se ha usado un método que se basa en la velocidad de sedimentación.

B) Densidad aparente

Se define como la razón de la masa de suelo seco respecto al volumen del mismo en su estado natural, es decir, considerando tanto el volumen que ocupan las partículas sólidas como el que ocupan los poros.

El procedimiento publicado por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación³ en 1986 consiste en recoger una muestra inalterada con un cilindro indeformable dos o tres días después de una precipitación o riego intenso. Una vez en el laboratorio, se seca en estufa a 105 °C hasta peso constante (**m**) y se deja enfriar en desecador para su posterior pesada.

La densidad aparente se calcula según la expresión:

$$\rho = m / V \quad (3.6)$$

donde **m** es la masa de suelo seco (g) y **V** es el volumen de la muestra que ocupa el cilindro (cm³), es decir, $V = 3.1416 (d/2)^2 \times h$, (**d** es el diámetro del cilindro en cm y **h** es la altura del cilindro en cm).

³ Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. *Métodos oficiales de análisis de suelos y aguas*. Ed. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, Madrid, España, p.182, 1986

C) Densidad real

Corresponde a la densidad de las partículas sólidas del suelo, es decir, a la masa del suelo dividida por el volumen que ocupan sus partículas. Para su determinación (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación³, 1986) se introducen en un picnómetro 50 g de suelo y se pesa todo el conjunto (P_1). A continuación se añade tolueno, aproximadamente hasta la mitad de su volumen, se introduce el picnómetro en un desecador a vacío y se aplica una presión aproximadamente 100 mm Hg inferior a la atmosférica, para facilitar la eliminación del aire que queda entre las partículas.

Seguidamente, se llena el matraz con tolueno, por exceso, y se mantiene en un baño dotado de termostato a una temperatura constante de 20° C, durante una media hora. Transcurrido este tiempo, se enrasa y se pesa (P_3). Previamente se habrá determinado el peso del picnómetro vacío (P) y el peso del picnómetro aforado enrasado con tolueno (P_2).

La densidad real se calcula a partir de la expresión:

$$\rho_r = (P_1 - P) \cdot \rho_t / [(P_1 - P) - (P_3 - P_2)] \quad (3.7)$$

donde ρ_t es la densidad del tolueno ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$), P es la tara del picnómetro (g), P_1 es el peso del picnómetro más suelo (g), P_2 es el peso del picnómetro lleno de tolueno (g), y P_3 es el peso del picnómetro más tolueno más suelo (g).

D) Porosidad

Es la relación entre el volumen de poros y el volumen total de la muestra de suelo. Se puede calcular indirectamente, a partir de los valores de la densidad aparente y de la densidad real, mediante la expresión (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación³, 1986):

$$\theta = [(\rho_r - \rho) / \rho_r] \cdot 100 \quad (3.8)$$

donde θ es la porosidad (%), ρ_r es la densidad real ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) y ρ es la densidad aparente ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$).

E) Humedad

El contenido en humedad del suelo en las condiciones del laboratorio se determina por diferencia de pesada entre una muestra de suelo antes y después de ser sometida a desecación a 105 °C hasta peso constante (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación³, 1986). El porcentaje en peso de agua contenida en cien gramos de suelo seco, se halla mediante la expresión:

$$H = [(P_H - P_S) / P_S] \cdot 100 \quad (3.9)$$

donde H es la humedad del suelo (%), P_H es el peso del suelo húmedo (g) y P_S es el peso del suelo seco (g).

F) Ensayo de permeabilidad

La determinación de la permeabilidad se ha llevado a cabo utilizando un permeámetro de carga variable. Se coloca la muestra en un recipiente cilíndrico y se compacta hasta tratar de reproducir la porosidad inicial. A la parte inferior de este recipiente se conecta un tubo manométrico de vidrio, de pequeño diámetro, lleno de agua hasta un nivel inicial (h_0), que debe estar por encima del desagüe del recipiente que contiene la muestra, de modo que, iniciando el ensayo, el agua aportada por el tubo manométrico fluye a través de la muestra ensayada. Entonces se mide el descenso del nivel de agua observado en el tubo en un tiempo determinado t .

La permeabilidad se calcula mediante la expresión:

$$K = 2,3 \cdot [(a \cdot l) / (A \cdot t)] \cdot \log (h_0/h) \quad (3.10)$$

Donde K es la permeabilidad ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$), a es la sección del tubo manométrico de vidrio (cm^2), l es la altura del molde (cm), A es la sección del molde (cm^2), t es el tiempo (s), h_0 es el nivel inicial del agua en el tubo manométrico y h es el nivel de agua en el tubo en el tiempo t .

Los resultados de las características físicas y mineralógicas (*Tabla 3.34*) muestran que el suelo estudiado es de textura fina, con predominio de limos finos y en menor proporción de limos gruesos y arcillas. Entre las arcillas predomina la illita, a la que le sigue en abundancia la esmectita. Las arcillas menos abundantes son las del grupo de la caolinita. Presenta un valor de la porosidad del 42.18 % y un valor relativamente bajo de la permeabilidad ($4.42 \cdot 10^{-5} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$), esto hace que posea características que

condicionan una baja capacidad de infiltración. A continuación, se recogen los resultados obtenidos.

Tabla 3.34 - Propiedades físicas del suelo estudiado.

Propiedades físicas			
Propiedades generales		Textura	
Densidad aparente ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)	1.39	Arenas totales (%)	20.00
Densidad real ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)	2.75	Limos gruesos (%)	24.50
Porosidad (%)	42.18	Limos finos (%)	33.55
Permeabilidad ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$)	$4.4\cdot 10^{-5}$	Arcillas (%)	21.95
Composición mineralógica			
Illita (%)	39.72	Caolinita (%)	10.25
Calcita (%)	23.71	Feldespatos (%)	8.34
Esmectita (%)	13.33	Cuarzo (%)	4.65

4.2.1.2 Propiedades químicas del suelo

A continuación se comenta las características químicas estudiadas.

A) pH

La determinación del pH (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación³, 1986) se ha efectuado sobre cuatro suspensiones, dos de ellas de suelo en agua y otras dos de suelo en disolución de cloruro potásico 0.1 N. La determinación de pH en KCl 0.1 N se realiza para estudiar la capacidad de intercambio iónico del suelo en estudio.

Para preparar las suspensiones se pesan 10 g de suelo, a los que se añade el volumen correspondiente de agua o de disolución de KCl 0.1 N (25 mL). Transcurrida una hora, se efectúa la medida del pH mediante un pH-

metro convencional, que ha sido calibrado previamente empleando dos disoluciones reguladoras de referencia (pH 7.02 y 4.00).

B) Materia orgánica

Se ha utilizado el método de Tyurin⁴ (1951), que es un método volumétrico de oxido-reducción por retroceso, en el que se oxida la materia orgánica del suelo, con un exceso medido de dicromato potásico. Posteriormente se valora la cantidad de dicromato que no ha reaccionado con disolución de Fe⁺² preparado a partir de sal de Mohr (Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O). El procedimiento consiste en pesar 0.2 g de suelo finamente molido en un mortero de ágata, que se introducen en un matraz erlenmeyer de 100 mL. Se añade sulfato de plata (catalizador), arena de mar (para homogeneizar la ebullición) y 10 mL de dicromato potásico 0.4 N y se introduce el conjunto en un baño de arena. Se lleva a ebullición y se mantiene durante 5 minutos más. Con el mismo procedimiento se hace una prueba en blanco. Por último se valora el dicromato en exceso, usando ácido fenilantranílico como indicador y como valorante una disolución de Fe⁺² preparada a partir de la sal de Mohr. El viraje se produce de violeta-azulado a verde. El contenido en materia orgánica (% en peso) se calcula mediante la expresión:

$$\text{M.O. (\%)} = \{[(V_b - V) \cdot F \cdot 0,3] / m\} \cdot F_1 \cdot F_2 \quad (3.11)$$

donde V_b es el volumen de sal de Mohr gastado en valorar el blanco (mL), V es el volumen de sal gastado en valorar la muestra (mL), F es el factor de sal, F_1 es el factor de corrección para calcular la cantidad de carbono

⁴ Tyurin I.V., *Analytical procedure for a comparative study of soil humus*. Trudy Pochr. Inst. Dokuchaeva 33: 5-21, 1951

orgánico, que se obtendría mediante el método de combustión seca, teniendo en cuenta la cantidad de carbono inorgánico y orgánico ($F_1 = 1.17$), F_2 es el factor de Van Bemmelen ($F_2 = 1.724$) y m es la masa de la muestra de suelo utilizada (g).

C) Aniones y cationes solubles del suelo

Los iones solubles del suelo son aquellos que se disuelven al incorporar agua al suelo seco; se miden en el extracto recogido de la pasta de saturación que se prepara añadiendo agua lentamente a la muestra de suelo, hasta que todos los poros estén llenos (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación³, 1986). Para conseguirlo, se toman 200 o 300 g de muestra de suelo y se colocan en un recipiente. Se adiciona lentamente agua destilada, al mismo tiempo que se agita con una espátula. Cuando toda la muestra ha sido humedecida, se continúa añadiendo agua destilada, pero en fracciones cada vez más pequeñas. Una vez conseguido el estado de saturación de la muestra del suelo, el recipiente debe ser tapado y se deja reposar durante un tiempo mínimo de 10 horas.

Para la obtención del extracto de saturación se conecta un kitasato a una bomba de vacío; sobre el kitasato se sitúa un embudo büchner (al que se le habrá colocado previamente un papel de filtro), se aplica vacío después de rellenar el embudo con una cantidad suficiente de la pasta saturada y se mantiene esta situación hasta haber obtenido suficiente volumen de extracto de saturación.

Una vez obtenido el extracto, se determinan mediante Cromatografía Iónica los aniones (cloruros, nitratos, nitritos, fosfatos y sulfatos) y los cationes (sodio, calcio, magnesio, potasio y amonio). Los resultados

obtenidos se expresan en miligramos del ión por kilogramo de suelo, teniendo en cuenta la humedad de la pasta saturada preparada, que se determina mediante el método descrito para determinar la humedad.

D) Nitrógeno total

El procedimiento (Bouat y Crouzet⁵, 1965) para determinar el nitrógeno total se divide en dos etapas:

- ⇒ La primera consiste en la destrucción de la materia orgánica y la transformación del nitrógeno en sales amónicas. En esta fase la materia orgánica se oxida a CO₂ y H₂O por ebullición con ácido sulfúrico concentrado, al tiempo que los citados compuestos nitrogenados se transforman en amonio (NH₄⁺), al formarse sulfato amónico. Para acelerar esta reacción, se emplean catalizadores (Cu⁺², Hg⁺², Se⁺²) y además se añaden sales que eleven el punto de ebullición del ácido, para evitar su evaporación.

- ⇒ La segunda etapa se subdivide a su vez en dos fases: la primera consiste en hacer reaccionar el sulfato amónico producido en la digestión con hidróxido sódico, para formar sulfato sódico y amoniaco gaseoso. Este último es separado por arrastre con aire y condensación. En la segunda fase se valora el amoniaco producido con ácido sulfúrico diluido, en presencia de un indicador adecuado.

De acuerdo con el método descrito, se colocan 2 g de suelo tamizado a un tamaño de 2 mm en un tubo de digestión, se les añade 1 g de sulfato

⁵ Bouat A., Crouzet C., *Notes techniques sur un appareil semi-automatique de dosage de l'azote (et de certains composés volatils)*. Annals of Agriculture 16; 107-118, 1965

potásico, 10 mL de ácido sulfúrico concentrado y 1 mL de solución sulfúrica de selenio, se calienta durante 1 hora a 100 °C y durante otra hora y media a 350 °C. Finalizado el calentamiento, se retira el tubo del digestor. Una vez enfriado, al tubo de digestión se le añade agua, hasta un volumen total de 25 mL, y unas gotas de fenolftaleína. A continuación, el tubo de digestión se acopla en el soporte de un destilador automático, donde se adiciona NaOH hasta el viraje del indicador a rojo y se comienza la destilación. Finalmente, en un matraz erlenmeyer de 250 mL, al cual se añaden 25 mL de ácido bórico al 4%, se recoge el destilado, que posteriormente se valora con ácido sulfúrico 0.005 N.

El porcentaje de nitrógeno en la muestra de suelo se calcula según la expresión:

$$N_T = (V \cdot N \cdot F \cdot 14) / (10 \cdot m) \quad (3.12)$$

donde N_T es el contenido en nitrógeno (%), V es el volumen de ácido gastado en la valoración (mL), N es la normalidad del ácido sulfúrico usado para la valoración, F es el factor de corrección del ácido sulfúrico usado para la valoración y m es la masa de la muestra (g).

E) Determinación analítica de la capacidad de cambio

La determinación de la capacidad de cambio catiónico (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación³, 1986) consta de los siguientes pasos:

⇒ Reemplazamiento completo de los cationes de cambio existentes en el suelo por otro catión.

- ⇒ Eliminación del exceso por lavado.

- ⇒ Desplazamiento del catión adsorbido y determinación cuantitativa del mismo.

El procedimiento consta de varios pasos: el primero consiste en colocar 5 g de suelo tamizado y secado al aire en una columna de intercambio iónico; se añade entonces acetato amónico 1 N hasta un volumen equivalente a 4/5 de la capacidad de la columna y se deja en reposo un mínimo de 8 horas para que se produzca el intercambio. Transcurrido este tiempo, se procede a abrir el embudo y a recoger el lixiviado, que se enrasa a un matraz aforado de 100 mL. En este lixiviado se miden las bases de cambio: Na^+ , K^+ , Ca^{+2} y Mg^{+2} .

A continuación, se rellena la columna con acetato sódico 1.0 N y se deja en contacto 8 horas para que se produzca el intercambio. Pasado este tiempo, se abre la columna para recoger el lixiviado, que es desechado. Para eliminar el exceso de sodio se lava varias veces con alcohol el conjunto suelo-columna.

Se añade de nuevo acetato amónico 1.0 N y se mantiene en contacto otras 8 horas. Transcurrido este tiempo, se recoge el lixiviado, se enrasa en un matraz aforado de 100 mL; en este lixiviado se mide el sodio, de modo que el resultado corresponde a la capacidad de intercambio catiónico total.

La capacidad total de cambio catiónico representa la capacidad máxima de cationes que pueden ser adsorbidos por el complejo de cambio, expresado en meq de Na^+ adsorbido por 100 g de suelo.

F) Carbonatos

Un peso determinado de muestra seca se introduce en un crisol en el horno de mufla, se eleva gradualmente la temperatura hasta 560 °C (a esta temperatura los carbonatos no se ven alterados) y se mantiene durante 3 h, se deja enfriar y se pesa (de la diferencia de pesos se obtiene el contenido en materia orgánica). Se vuelve a introducir el crisol en la estufa y se calienta gradualmente hasta 950 °C, se deja 2 h. Se enfría y se pesa. De esta forma, descontada la materia orgánica, se puede conocer el contenido en carbonatos.

Los resultados obtenidos acerca de las características químicas del suelo estudiado se recogen en la **Tabla 3.35**.

Tabla 3.35 - Propiedades químicas suelo estudiado.

Propiedades químicas			
pH (KCl)	7.40	Cationes solubles del suelo (mg·Kg⁻¹)	
pH (agua)	7.90	Ca ⁺²	44.50
Materia orgánica (%)	1.81	Mg ⁺²	37.00
Carbono orgánico (%)	1.05	Na ⁺	42.50
Carbonatos (% CO ₂)	15.4	Minerales	
Nitrógeno total (%)	0.07	Al ₂ O ₃ (%)	12.76
Capacidad de cambio (meq Na ⁺ / 100 g)	22.12	SiO ₂ (%)	46.35
Bases de cambio (meq / 100 g)		Fe ₂ O ₃ (%)	4.97
Ca ⁺²	29.78	MnO (%)	0.08
Mg ⁺²	2.56	MgO (%)	4.01
Na ⁺	0.34	Na ₂ O (%)	1.76
K ⁺	0.49	K ₂ O (%)	2.15
Aniones solubles del suelo (mg·Kg⁻¹)		TiO ₂ (%)	0.61
SO ₄ ⁻²	241.00	P ₂ O ₅ (%)	0.24
Cl ⁻	91.50	CaO (%)	10.52

Como se puede apreciar en la tabla, el suelo estudiado presenta un valor de pH ligeramente básico (7.9). La presencia de KCl en el medio provoca una disminución de aproximadamente una unidad en el valor del pH,

pasando a ser más neutro, lo que indica que el suelo actúa como cambiador iónico, con gran capacidad para la fijación de hidrogenoiones. El valor de materia orgánica obtenido fue 1.81 %, y los óxidos de Fe^{+3} y Al^{+3} que fueron determinados por fluorescencia de Rayos-X, representan el 4.97 y 12.76 % de la totalidad de los minerales detectados por la misma metodología. En general, con el valor de pH que presenta el suelo estudiado (7.9), dichos óxidos e hidróxidos presentan una carga positiva, y junto a la calcita (CaCO_3) y al óxido de magnesio, confieren al suelo una sensible capacidad de intercambio de aniones.

Otra de las propiedades importantes relacionada con la capacidad de adsorción del suelo es la capacidad de cambio catiónico, que corresponde al total de las cargas negativas disponibles para fijar cationes en disolución. El suelo de la Vega de Granada posee una elevada capacidad de cambio, de 22.12 meq de sodio/100 g de suelo.

También se encuentra una elevada concentración de sulfatos y cloruros solubles, lo que está relacionado con la composición de la roca madre de la zona.

En resumen, las propiedades físico-químicas del suelo estudiado revelan, en primer lugar, que los compuestos del mismo, al tener carácter coloidal y poseer cargas eléctricas, pueden contribuir de forma relevante a la interacción sólido-fluido y a su capacidad de cambio. En segundo lugar, es evidente que las propiedades físicas del suelo que dependen de su textura y estructura, influyen de manera significativa y decisiva en el comportamiento del mismo frente al movimiento vertical del agua.

4.2.2 - Estudio del agua de pozo empleada

Se realizó la determinación de los siguientes iones: cloruros, sulfatos, fosfatos, nitratos, nitritos, sodio, calcio, magnesio, potasio, hierro y aluminio, mediante cromatografía iónica, empleando para ello un cromatógrafo iónico marca *Dionex*, modelo DX300.

Todas las muestras se filtraron a través de un filtro de fibra de vidrio con $0.22\ \mu\text{m}$ de diámetro de poro, utilizando una jeringa de 10 mL de capacidad, equipada con un cono (luer), antes del análisis cromatográfico.

Con la finalidad de separar los aniones de la muestra, ésta fue inyectada en una corriente de eluyente, con un caudal de $1.3\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. El eluyente fue una disolución de $3.5\ \text{mM}\ \text{Na}_2\text{CO}_3/1.0\ \text{mM}\ \text{NaHCO}_3$. La separación se realizó a través de una columna separadora de iones Ionpac AS 14 (4x250 mm), compuesta por una resina pelicular intercambiadora de aniones con base de divinilbenceno. El equipo está provisto adicionalmente de precolumnas Ionpac AS (4x5 mm) para proteger la columna analítica. Los aniones separados en las columnas pasaron a través de una supresora de membrana (*AMM-II*), a través de la cual circulaba continuamente una solución regeneradora ácida de ácido sulfúrico 0.1 N. En la membrana supresora, los aniones separados se transformaban en su forma ácida de alta conductividad y el disolvente se convierte en ácido carbónico de baja conductividad. Los aniones separados se detectaron con un detector de conductividad y compensación de temperatura de 1.3 a 2 % por grado centígrado. Dichos aniones se identificaron a partir del tiempo de retención comparado con el de los correspondientes patrones y la determinación cuantitativa se realizó integrando el área del pico mediante un integrador (*Dionex 4400*), que recibía la señal del cromatógrafo,

evaluando las áreas correspondientes y trazando los cromatogramas.

Previamente se realizó una calibración con los patrones de los aniones estudiados, comprobando la linealidad de la respuesta relacionada con el intervalo de concentraciones elegido de todos los compuestos. En la **Tabla 3.36** se muestran los intervalos de calibración.

Tabla 3.36 - Intervalos de calibrado para los aniones.

Concentraciones ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	
Cl ⁻	[3.0 - 20.0]
NO ₂ ⁻	[1.0 - 5.0]
NO ₃ ⁻	[1.0 - 10.0]
PO ₃ ⁻⁴	[1.0 - 5.0]
SO ₄ ⁻²	[3.0 - 20.0]

La separación de los cationes, se basó en el mismo fenómeno pero en este caso se utilizó una columna de separación de cationes Ionpac CS 12A (4x250 mm), con una fase estacionaria de grupo divinilbenceno y un grupo funcional de carboxilato. El eluyente fue una disolución de ácido sulfúrico 0.02 N y la supresión, a diferencia del caso de los aniones, no fue química sino eléctrica, de modo que se utilizó una supresora de membrana CSRS - ultra - 4 mm. Para la detección, igual que en el caso anterior, se utilizó una célula de conductividad. El caudal para el eluyente de cationes se fijó en $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ y el detector se ajustó a $1 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. La fuente de alimentación de la supresora se mantuvo a una corriente de 100 mA. Como en el caso de los aniones, después de estabilizar el sistema, se

inyectó un patrón, en este caso de cationes, para su comprobación.

Para los cationes también se llevó a cabo una calibración con patrones, comprobando la linealidad de la respuesta en el intervalo de concentraciones elegido de todos los compuestos. En la **Tabla 3.37** se muestran los intervalos de calibración.

Tabla 3.37 – Intervalos de calibrado para los cationes.

Concentraciones (mg·L ⁻¹)	
Na ⁺	[5.0 - 20.0]
NH ₄ ⁺	[1.0 - 5.0]
K ⁺	[2.0 - 5.0]
Ca ⁺²	[5.0 - 20.0]
Mg ⁺²	[5.0 - 20.0]

Tanto en la calibración de los aniones como en la de los cationes, las disoluciones patrón se prepararon con agua Milli-Q, diluyendo disoluciones acuosas concentradas de 1000 mg·L⁻¹ de los iones correspondientes. Una vez preparadas las disoluciones patrón, se inyectaron en el sistema de análisis para proceder a la calibración. Este proceso se repitió cada 20 determinaciones y siempre que tuvo lugar algún cambio de ajuste del detector o algún cambio en el sistema.

Para determinar el pH y la conductividad eléctrica del agua se utilizó un pH-metro WTW (pH 196) y un conductímetro WTW (LF 537), respectivamente.

En la **Figura 3.35** se muestra, a modo de ejemplo, uno de los cromatogramas obtenidos durante el análisis de las muestras.

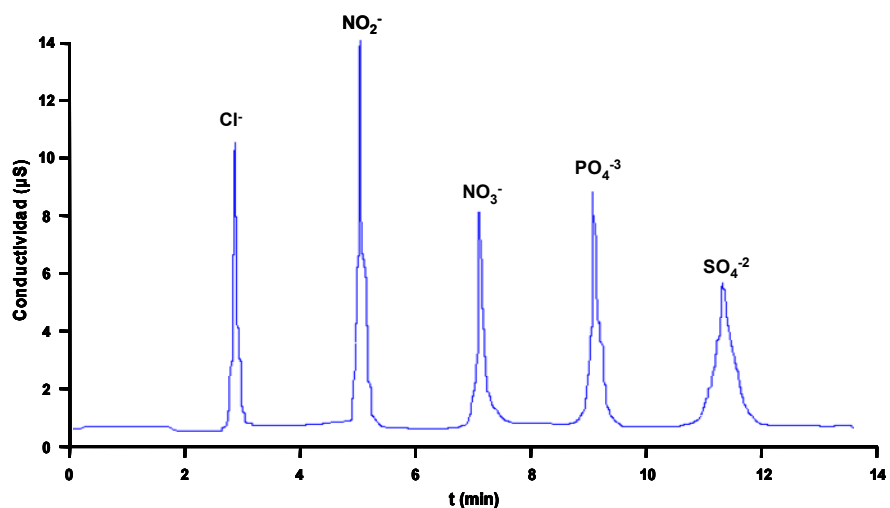


Figura 3.35 - Cromatograma de determinación de los aniones.

En la **Tabla 3.38** se muestran los resultados obtenidos en la caracterización del agua de pozo.

Tabla 3.38 - Características del agua de pozo.

Características			
Cl ⁻ (mg·L ⁻¹)	23.60	Na ⁺ (mg·L ⁻¹)	26.25
NO ₂ ⁻ (mg·L ⁻¹)	23.40	K ⁺ (mg·L ⁻¹)	6.00
NO ₃ ⁻ (mg·L ⁻¹)	60.60	Ca ⁺² (mg·L ⁻¹)	45.00
PO ₄ ⁻³ (mg·L ⁻¹)	43.60	Mg ⁺² (mg·L ⁻¹)	4.42
SO ₄ ⁻² (mg·L ⁻¹)	95.00	Al ⁺³ (mg·L ⁻¹)	0.02
SiO ₂ (mg·L ⁻¹)	12.22	Fe ⁺³ (mg·L ⁻¹)	0.13
pH	7.53	Conductividad (µS)	1026

4.3 - Experiencia en campo

Este estudio se realizó con el objetivo de evaluar la biodegradación del LAS en un ambiente natural, donde puede acumularse por diferentes vías y mecanismos. Para la realización de los experimentos se empleó la irrigación forzada analizándose muestras provenientes del agua lixiviada de estos riegos.

Para la realización de todas las experiencias de campo fueron necesarias algunas etapas previas concernientes a la puesta a punto de la metodología, que incluye tanto la preparación de la zona de experimentación como la adecuada selección de los materiales empleados.

4.3.1 - Descripción de la parcela experimental

La parcela experimental está situada en la Vega de Granada. Con una extensión de 2.500 m², se encuentra subdividida en subparcelas de 36 m², una de la cual se han utilizado para los ensayos de la presente investigación. Un aspecto de las subparcelas se muestra en la *Figura 3.36*.

En la subparcela experimental se colocaron tres series de tres hidrocaptos, totalizando nueve hidrocaptos, situados a una distancia entre sí de aproximadamente 1 metro y a profundidades de 25, 50 y 75 cm respectivamente.



Figura 3.36 - Vista general de las parcelas experimentales.

4.3.2 - Puesta a punto de la metodología de toma de muestras de agua

Los materiales seleccionados para la fabricación de los hidrocaptadores fueron PVC y acero inoxidable (*Figura 3.37*) previo estudio del comportamiento del tensioactivo LAS frente a distintos materiales que podrían emplearse en la fabricación de estos hidrocaptadores⁶.

⁶ Nimer M., *Estudio del comportamiento ambiental del sulfonato de alquilbenceno lineal (LAS) en una parcela agrícola de la vega de Granada*. Tesis Doctoral. Departamento de Química Analítica. Universidad de Granada, 2008.

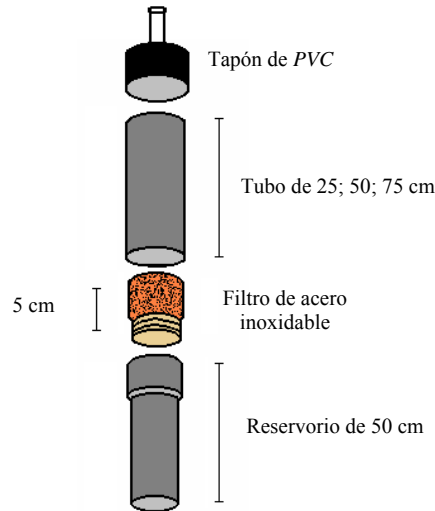


Figura 3.37 - Estructura del hidrocaptor.

Cada hidrocaptor está compuesto por un tubo de PVC de 50 mm de diámetro, con longitudes de 25.0, 50.0 y 75.0 cm según el caso, que lleva sellado en su extremo inferior una cápsula de acero inoxidable y en el extremo superior, un tapón perforado en su centro donde se le ha introducido un tubo metálico de unos 5 mm de diámetro, a través del cual se aplica vacío mediante una bomba eléctrica y la toma de muestra.

La instalación de los hidrocaptos en suelo se realizó perforando de forma manual con una barrena helicoidal *Eijkelkamp*, hasta las profundidades mencionadas.

El hidrocaptor se introdujo en la perforación realizada y se rodeó de una pasta compuesta de suelo, de los alrededores de la zona de estudio, tamizada a 2 mm, y agua. La textura debe ser la adecuada para asegurar una buena uniformidad en el hueco interanular que se genera entre el

hidrocaptor y el suelo, evitando así caminos preferenciales que falseen las medidas experimentales. Además, puede ocurrir que a la hora de irrigar la zona de estudio, el agua tienda a acceder hacia el hidrocaptor por esta zona. Si se considera que preferentemente el flujo es vertical; la veracidad de las medidas así tomadas podrían ser discutibles. Para evitar estos flujos preferenciales se colocó alrededor del cilindro superior de PVC, a nivel de tierra, un disco de material plástico que cubría unos 4 o 5 cm de terreno alrededor del hidrocaptor; con lo cual se forzaría que el drenaje del agua se realizara a través de suelo representativo. Con objeto de evitar la alteración de la superficie de la parcela por los trabajos a realizar y al mismo tiempo facilitar la toma de muestra, se situaron dos plataformas metálicas en los pasillos limitados por las tres filas de hidrocaptos. La toma de muestra se hizo con una bomba de vacío eléctrica *Schott Iberica MZ 2C* aplicando de forma continua un vacío de 60 cbar.

En la **Figura 3.38** se muestra un esquema representativo relacionado con la colecta de las muestras por medio de los hidrocaptos, situados a distintas profundidades (25.0, 50.0, 75.0 cm).

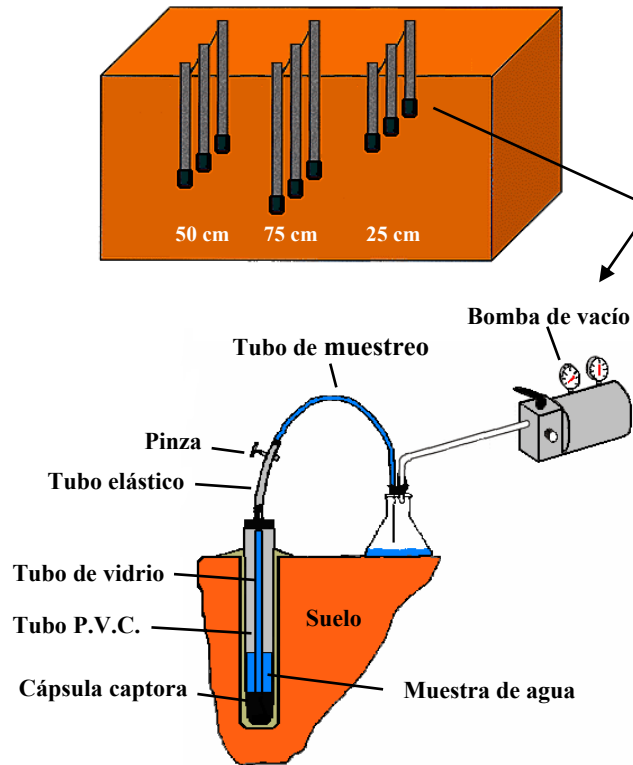


Figura 3.38 - Esquema de los hidrocaptadores fijados en el suelo a distintas profundidades y de la colecta de muestras líquidas.

Para la toma de muestras provenientes de los hidrocaptadores, se instalaron unos tubos de polietileno conectados a la bomba de vacío entre los que se intercalaban sus correspondientes kitsatos de 500 mL de capacidad volumétrica. De modo ilustrativo, en la siguiente imagen se muestra con detalle la operación de colecta en los hidrocaptadores.



Figura 3.39. Operación de colecta de muestras de agua.

4.3.3 - Resultados

Se procedió a regar la parcela el primer día de estudio con 4799.2 L de agua que contenían 449.5 g de LAS comercial (concentración final de LAS: $41.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). El tiempo de lixiviación se estimó en 4 horas. Los siguientes riegos se realizaron los días 6, 13, 20 y 27, llevando a cabo la toma de muestra los días 2, 7, 14, 23 y 30.



Figura 3.40 - Aplicación de LAS en la parcela agrícola.

Una vez colectadas las muestras, se adicionó formol para inhibir la actividad bacteriana y se transportaron en nevera al laboratorio, donde se procedió a su análisis. Las muestras (100 mL) se evaporaron en rotavapor y se concentraron y purificaron mediante extracción en fase sólida para posteriormente ser determinadas mediante LC-FD y CE-DAD.

No se dispone de resultados a 75 cm de profundidad porque la cantidad de agua que llegaba a estos hidrocaptos no era suficiente para llevar a cabo el análisis.

En las **Tablas 3.39** y **3.40** se muestran los resultados obtenidos (expresados como media de tres valores, uno por cada hidrocaptor) mediante LC-FD a 25 y 50 cm de profundidad, respectivamente.

En las **Tablas 3.41** y **3.42** se muestran los resultados obtenidos (expresados como media de tres valores, uno por cada hidrocaptor) mediante CE-DAD a 25 y 50 cm de profundidad, respectivamente.

Tabla 3.39 - Concentración de los diferentes SPCs obtenidas mediante LC-FD, en las muestras de agua de los hidrocaptos situados a 25 cm de profundidad.

Programa	Concentraciones a 25 cm (ng·mL ⁻¹)						
	LAS*	C ₂	2C ₃	2C ₄	3C ₄	4C ₄	5C ₅
Día 1	Riego con agua + LAS						
Día 2	10.1	< LQ	2	32	< LQ	< LD	< LD
Día 6	Riego con agua						
Día 7	1.4	49	17	30	25	5	< LD
Día 13	Riego con agua						
Día 14	0.1	8	3	5	7	14	< LD
Día 20	Riego con agua						
Día 23	0.1	3	< LD	< LD	2	4	< LD
Día 27	Riego con agua						
Día 30	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD

*Concentración expresada en $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; < LD: menor que el límite de detección; < LQ: menor que el límite de cuantificación

Tabla 3.40 - Concentración de los diferentes SPCs halladas mediante LC-FD, en las muestras de agua de los hidrocaptos situados a 50 cm de profundidad.

Programa	Concentraciones a 50 cm (ng·mL ⁻¹)						
	LAS*	C ₂	2C ₃	2C ₄	3C ₄	4C ₄	5C ₅
Día 1	Riego con agua + LAS						
Día 2	7.3	< LD	< LD	13	10	< LD	< LD
Día 6	Riego con agua						
Día 7	0.6	6	3	4	6	23	< LD
Día 13	Riego con agua						
Día 14	0.1	11	3	< LD	10	23	< LD
Día 20	Riego con agua						
Día 23	0.1	3	< LQ	< LD	3	5	< LD
Día 27	Riego con agua						
Día 30	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD

*Concentración expresada en $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; < LD: menor que el límite de detección; < LQ: menor que el límite de cuantificación

Tabla 3.41 - Concentraciones de los diferentes SPCs obtenidas mediante CE-DAD, en las muestras de agua procedentes de los hidrocaptos situados a 25 cm de profundidad.

Programa	Concentraciones a 25 cm (ng·mL ⁻¹)						
	LAS*	C ₂	2C ₃	2C ₄	3C ₄	4C ₄	5C ₅
Día 1	Riego con agua + LAS						
Día 2	10.1	< LD	< LD	33	< LQ	< LD	< LD
Día 6	Riego con agua						
Día 7	1.4	49	18	31	26	6	< LD
Día 13	Riego con agua						
Día 14	0.1	8	< LQ	< LQ	6	14	< LD
Día 20	Riego con agua						
Día 23	0.1	< LQ	< LD	< LD	< LQ	< LQ	< LD
Día 27	Riego con agua						
Día 30	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD

*Concentración expresada en µg·mL⁻¹; < LD: menor que el límite de detección; < LQ: menor que el límite de cuantificación

Tabla 3.42 - Concentraciones de los diferentes SPCs, halladas por EC-DAD, en las muestras de agua procedentes de los hidrocaptos situados a 50 cm de profundidad.

Programa	Concentraciones a 50 cm (ng·mL ⁻¹)						
	LAS*	C ₂	2C ₃	2C ₄	3C ₄	4C ₄	5C ₅
Día 1	Riego con agua + LAS						
Día 2	7.3	< LD	< LD	12	9	< LD	< LD
Día 6	Riego con agua						
Día 7	0.6	5	< LQ	< LQ	5	23	< LD
Día 13	Riego con agua						
Día 14	0.1	9	< LQ	< LD	9	21	< LD
Día 20	Riego con agua						
Día 23	0.1	< LQ	< LD	< LD	< LQ	5	< LD
Día 27	Riego con agua						
Día 30	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD

*Concentración expresada en µg·mL⁻¹; < LD: menor que el límite de detección; < LQ: menor que el límite de cuantificación

Según el estudio de campo realizado podría concluirse que el LAS es biodegradado durante su lixiviación ya que se han encontrado sus principales productos de biodegradación, tal y como se describe en la Introducción de la presente Memoria, en las muestras analizadas. Este hecho, combinado con otros estudios de campo⁶ similares a éste, pero focalizados en la determinación de LAS en suelo y agua de riego a distintas profundidades, podrían ser considerados como una evidencia experimental de que el LAS es prácticamente biodegradado antes de alcanzar la zona saturada del acuífero, y por tanto, no se produciría contaminación de este acuífero al regar el suelo agrícola con agua residual que contuviera LAS. Como ejemplo del citado estudio, en la **Figura 3.41** se presenta la evolución de la concentración del LAS en suelo a distintos tiempos y profundidades después de realizarse la aplicación.

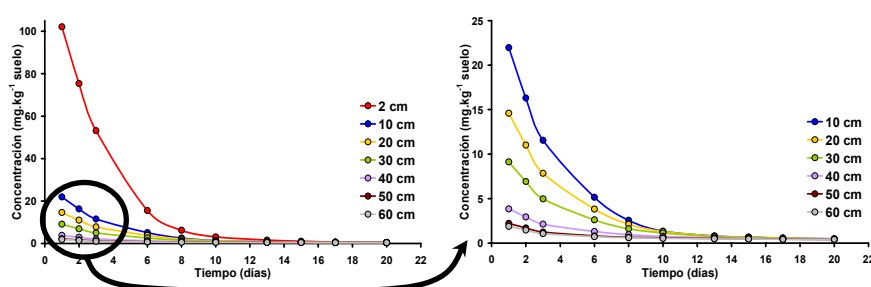


Figura 3.41 - Evolución de la concentración de LAS a distintos tiempos después de llevar a cabo la aplicación del mismo y a diferentes profundidades.

Finalmente, otra conclusión del presente estudio de campo es que el tiempo de vida de los SPCs es reducido, no encontrándose cantidades superiores al límite de detección a partir del día 30 de la aplicación y por tanto estos metabolitos no tendrían el problema de acumularse en el medio ambiente como ocurre con los productos de degradación de otros tensioactivos.

CAPÍTULO 4

**DETERMINACIÓN DE AP Y APEO
EN MUESTRAS DE SUELO**

En este capítulo se abordan tres temáticas distintas:

En primer lugar se desarrolla la metodología analítica para la determinación de alquilfenoles (AP) y alquilfenoles etoxilados (APEO) en suelos mediante cromatografía líquida con detección fluorescente.

En segundo lugar se trata el desarrollo de metodología analítica para la determinación de alquilfenoles y alquilfenoles etoxilados en suelos mediante cromatografía de gases con detección de masas.

En tercer y último lugar se expone la aplicación de la metodología desarrollada para llevar a cabo por una parte, la determinación de alquilfenoles y alquilfenoles etoxilados en muestras de suelo agrícola colectadas en distintos puntos de la Vega de Granada, y por otra, un estudio de campo consistente en la determinación de 4-*t*-octilfenoles etoxilados en suelo agrícola tratado previamente con estos tensioactivos.

La ausencia de patrones individuales comerciales de APEO de más de dos unidades etoxiladas obliga al uso de mezclas comerciales. En esta Memoria se han usado dos mezclas: Igepal CA-520 e Igepal CA-210, ambas constituidas por 4-*t*-octilfenoles etoxilados con distintos grados de etoxilación. La media de unidades etoxiladas de la mezcla Igepal CA-520 es 5, mientras que la de la mezcla Igepal CA-210 es 1. La caracterización de estas mezclas se llevó a cabo mediante LC-FD. Además del Igepal CA-520 e Igepal CA-210, los compuestos objeto de estudio de este capítulo son el 4-*terc*-octilfenol (4-*t*-OP), 4-*n*-octilfenol (4-*n*-OP) y 4-*n*-nonilfenol (4-*n*-NP).

1.- DESARROLLO DE METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE AP Y APEO MEDIANTE LC-FD

El objetivo de este trabajo es desarrollar una metodología analítica de buenas características basada en el uso de cromatografía líquida de alta resolución con detección fluorescente (LC-FD) para determinar APEO y AP en muestras de suelo.

El método consta de tres etapas bien diferenciadas:

- Extracción de los analitos con disolventes presurizados (PLE).
- Purificación y preconcentración mediante extracción en fase sólida (SPE).
- Separación y detección mediante LC-FD.

Aunque el protocolo de análisis sigue el orden anteriormente indicado, éste se modificó para llevar a cabo la optimización de las distintas variables químicas e instrumentales. Así, se comenzó con la optimización de la separación cromatográfica, seguido de la purificación del extracto y preconcentración de los analitos y se concluyó con la optimización de las variables influyentes en el procedimiento de extracción con disolventes presurizados.

1.1 - Optimización de las variables implicadas en el procedimiento cromatográfico

1.1.1 - Selección de la fase estacionaria

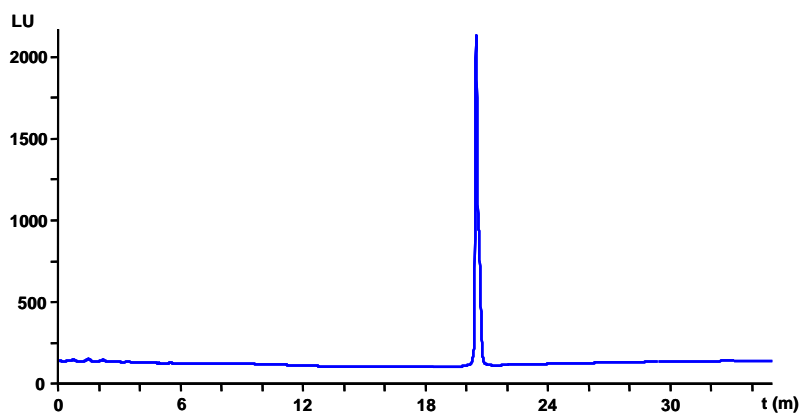
Atendiendo a la bibliografía consultada, se ensayaron tres tipos de columnas:

- *Gemini C₁₈*, 150 cm x 4.6 mm con 5 µm de tamaño de partícula.
- *Phenomenex Luna-Amino*, 250 cm x 4.6 mm con 5 µm de tamaño de partícula.
- *Lichrocart RP-C₁₈*, 250 cm x 4.6 mm, con 5 µm de tamaño de partícula.

Las condiciones cromatográficas empleadas con cada columna se seleccionaron tras la revisión bibliográfica. En la **Tabla 4.1** se muestran las condiciones cromatográficas empleadas con la columna *Gemini C₁₈* y en la **Figura 4.1** el cromatograma obtenido usando estas condiciones. En todos los ensayos se inyectó una disolución de Igepal CA-520 con la concentración indicada en el cromatograma obtenido.

Tabla 4.1 - Condiciones cromatográficas usadas¹ con la columna Gemini.

Gemini C ₁₈ (150 cm x 4.6 mm x 5 μm)		
Inyección	100 μL	
Flujo	0.8 mL·min ⁻¹	
Temperatura	40 °C	
	A: H ₂ O, 0.1 % TFA	
	B: ACN	
	t (min)	A (%)
Fase Móvil	0	55
	30	20
	31	0
	38	0
	40	55
Detección	λ _{exc} : 225 nm; λ _{em} : 305 nm	
Ganancia	12	

**Figura 4.1 - Cromatograma obtenido para una disolución de Igepal CA-520 (540 μg·mL⁻¹) en H₂O-ACN (45:55, v/v) empleando las condiciones de la Tabla 4.1.**

¹ Zafra-Gómez A., Ballesteros O., Navalón A., Vilchez J.L., *Determination of some endocrine disrupter chemicals in urban wastewater samples using liquid chromatography–mass spectrometry*. *Microchem. J.* 88; 87-94, 2008.

Se observa que todos los componentes de la mezcla Igepal CA-520 se resuelven en un solo pico y por tanto esta columna, con las condiciones empleadas, no permite discriminar los oligómeros que forman parte de la mezcla estudiada.

A continuación se realizaron tres pruebas con la columna *Phenomenex Luna-Amino* empleando para ello distintas fases móviles y gradientes, y trabajando en fase normal.

En las **Tablas 4.2 a 4.4** se recopilan las condiciones cromatográficas usadas y en las **Figuras 4.2 a 4.4** se muestran los cromatogramas obtenidos.

Tabla 4.2 - Condiciones cromatográficas² usadas con la columna *Phenomenex*.

Phenomenex Luna-Amino (250 cm x 4.6 mm x 5 µm)	
Inyección	100 µL
Flujo	1.0 mL·min ⁻¹
Temperatura	40 °C
Fase Móvil	A: Hexano-THF (80:20, v/v) B: IPA-H ₂ O (90:10, v/v) Gradiente: 98 - 50 % A, 0 - 60 min
Detección	λ _{exc} : 225 nm; λ _{em} : 304 nm
Ganancia	12

² Van Der Maeden F.P.B., Biemond M.E.F., Janssen P.C.G., *Oligomer separation by gradient elution High-Performance Liquid Chromatography*. J. Chrom. 149; 539-552, 1978.

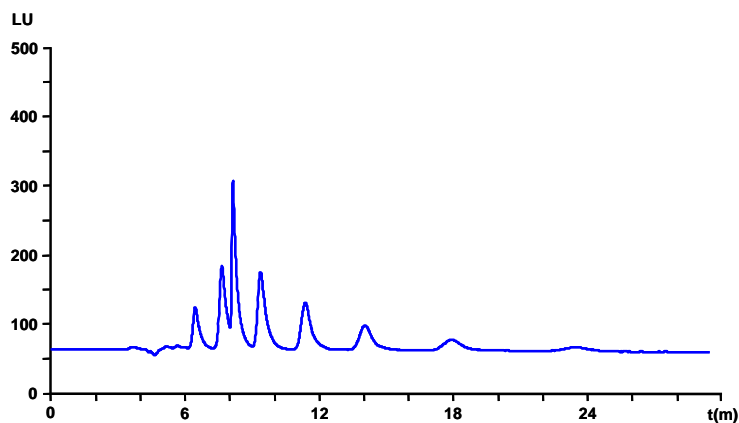


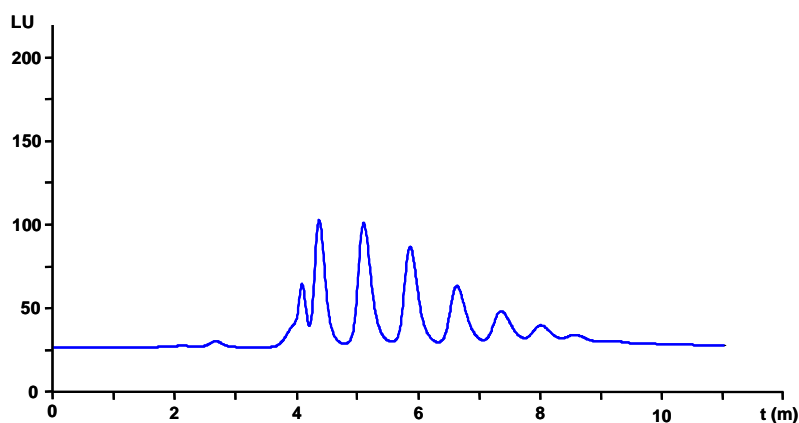
Figura 4.2 - Cromatograma obtenido para una disolución de Igepal CA-520 ($54 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) en Hexano-THF (80:20, v/v) empleando las condiciones de la Tabla 4.2.

Con estas condiciones se obtienen 8 picos, 2 de ellos parcialmente solapados, con una morfología considerablemente peor al aumentar el tiempo de análisis.

En la **Tabla 4.3** se recogen las condiciones empleadas en la segunda prueba con la columna *Phenomenex Luna-Amino* en la que se emplea como fase orgánica el metil-*t*-butiléter (MTBE).

Tabla 4.3 - Condiciones cromatográficas usadas³ con la columna Phenomenex.

Phenomenex Luna-Amino (250 cm x 4.6 mm x 5 µm)	
Inyección	100 µL
Flujo	2.0 mL·min ⁻¹
Temperatura	20 °C
Fase Móvil	A: MTBE, 0.1 % AcOH B: ACN-MeOH (95:5), 0.1 % AcOH Gradiente: 100 - 0 % A, 0 - 30 min
Detección	λ_{exc} : 230 nm; λ_{em} : 302 nm
Ganancia	12

**Figura 4.3 - Cromatograma obtenido para una disolución de Igepal CA-520 (54 µg·mL⁻¹) en MTBE empleando las condiciones de la Tabla 4.3.**

Con estas nuevas condiciones cromatográficas se obtuvieron también ocho picos, dos de ellos solapados. Posteriormente, al realizar una

³ Holt M S., McKerrell E.H., Perry J., Watkinson R.J., *Determination of alkylphenol ethoxylates in environmental samples by HPLC coupled to fluorescence detection*. J. Chrom. 362; 419-424, 1986.

inyección sólo de disolvente se comprobó que el primer pico correspondía a la fase móvil.

En la **Tabla 4.4** se recogen las condiciones usadas en la tercera prueba llevada a cabo con la columna *Phenomenex Luna-Amino*:

Tabla 4.4 - Condiciones cromatográficas usadas⁴ con la columna Phenomenex.

Phenomenex Luna-Amino (250 cm x 4.6 mm x 5 µm)	
Inyección	100 µL
Flujo	1.5 mL·min ⁻¹
Temperatura	20 °C
Fase Móvil	A: Hexano-IPA (90:10) B: IPA-H ₂ O (90:10) Gradiente: 97 - 37 % A, 0 - 60 min
Detección	λ _{exc} : 230 nm; λ _{em} : 302 nm
Ganancia	12

⁴ Ahel M., Giger W., *Determination of nonionic surfactants of the alkylphenol polyethoxylate type by high-performance liquid chromatography*. Anal Chem. 57; 2584-2590, 1985.

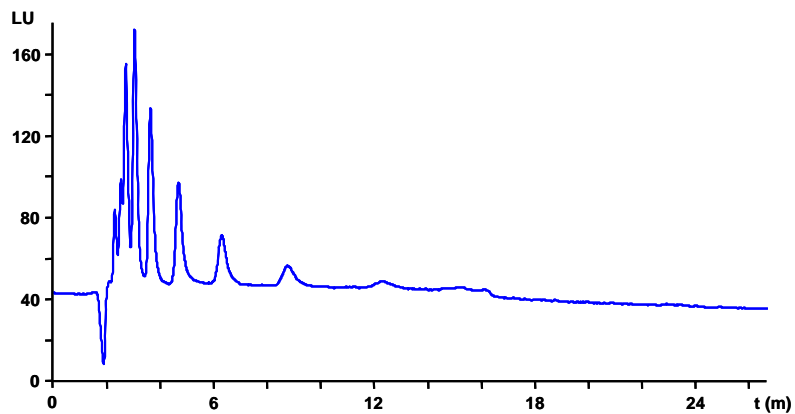


Figura 4.4 - Cromatograma obtenido para una disolución de Igepal CA-520 ($54 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) en Hexano-IPA (90:10, v/v) empleando las condiciones de la Tabla 4.4.

En esta tercera prueba se obtienen picos muy solapados que aparecen muy cerca del tiempo muerto, lo cual indica que no hay una retención adecuada o suficiente de los analitos en la columna.

Finalmente en la **Tabla 4.5** se recogen las condiciones empleadas con la columna *Lichrocart RP-C₁₈*:

Tabla 4.5 - Condiciones cromatográficas usadas⁵ con la columna Lichrocart.

Phenomenex Luna-Amino (250 cm x 4.6 mm x 5 μm)	
Inyección	5 μL
Flujo	1.0 mL·min ⁻¹
Temperatura	40 °C
Fase Móvil	A: H ₂ O / B: THF Isocrático: 50 - 50 %A
Detección	λ _{exc} : 230 nm; λ _{em} : 302 nm
Ganancia	12

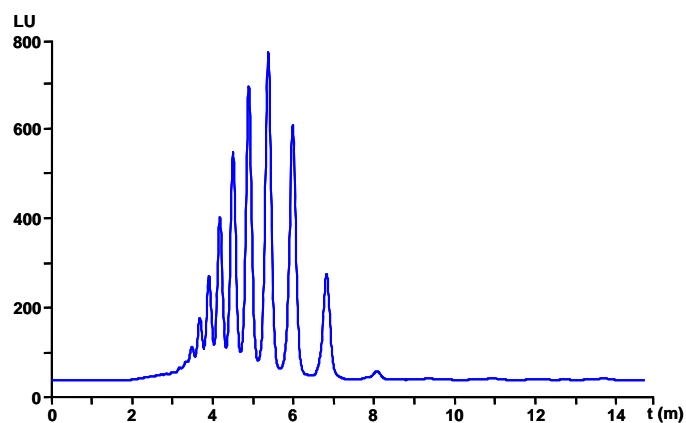


Figura 4.5 - Cromatograma obtenido para una disolución de Igepal CA-520 (540 μg·mL⁻¹) en THF-H₂O (50:50, v/v) empleando las condiciones de la Tabla 4.5.

⁵ Takasu T., Iles A., Hasebe K., *Determination of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates by reversed-phase high-performance liquid chromatography and solid-phase extraction*. Anal. Bioanal. Chem. 372; 554-561, 2002.

En el cromatograma se observan doce picos cromatográficos con buena morfología, obtenidos en un tiempo de análisis relativamente corto. Dado que se trata de un gradiente en fase normal, el pico con mayor tiempo de retención (8.1 minutos) corresponde al componente menos polar de la mezcla, es decir el 4-*t*-OP₁EO. Cada uno de los picos precedentes corresponde por orden inverso al compuesto con 1 unidad etoxilada menos en su molécula.

La correspondencia de picos se verificó inyectando una disolución de Igepal CA-210 empleando las condiciones de la **Tabla 4.5**.

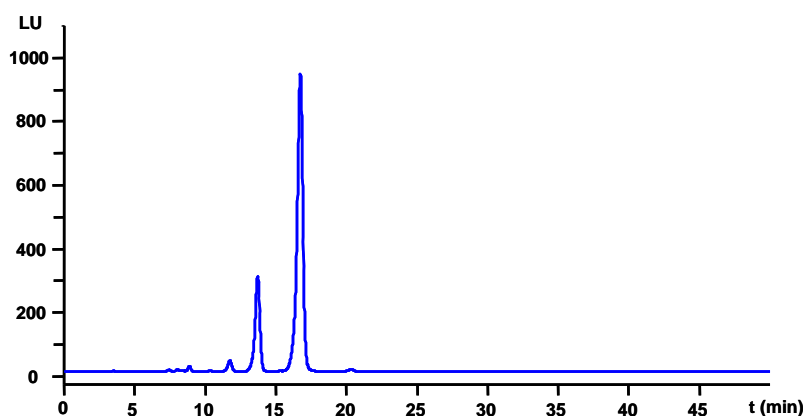


Figura 4.6 - Cromatograma obtenido para una disolución de Igepal CA-210 ($210 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) en THF- H_2O (50:50, v/v) empleando las condiciones de la **Tabla 4.5**.

Tras analizar los resultados obtenidos en estos experimentos se seleccionó la columna *Lichrocart RP-C₁₈* por ser la que permite obtener un mayor número de picos para la mezcla Igepal CA-520 y por tanto una mayor elucidación de los componentes de la mezcla. La distribución que aparece en la **Figura 4.5** está en concordancia con la media de 5 unidades

etoxiladas que contiene la mezcla. Además, al trabajar en fase normal los picos correspondientes a alquilfenoles presentarán mayores tiempos de retención, por tanto podrán determinarse de un modo simple, alargando el tiempo de análisis.

1.1.2 - Optimización del porcentaje de tetrahidrofurano en la fase móvil

Con objeto de mejorar la resolución de los picos obtenidos usando la columna Lichrocart RP-C₁₈, se probó a modificar la proporción H₂O-THF del método isocrático inicial.

Los experimentos que se desarrollan a continuación se llevaron a cabo empleando una disolución de Igepal CA-520 de 540 µg·mL⁻¹ en THF-H₂O (50:50, v/v).

Se redujo el porcentaje de THF del 50 al 35 % con el objetivo de aumentar la interacción de los analitos con el adsorbente, obteniendo el cromatograma mostrado en la *Figura 4.7*.

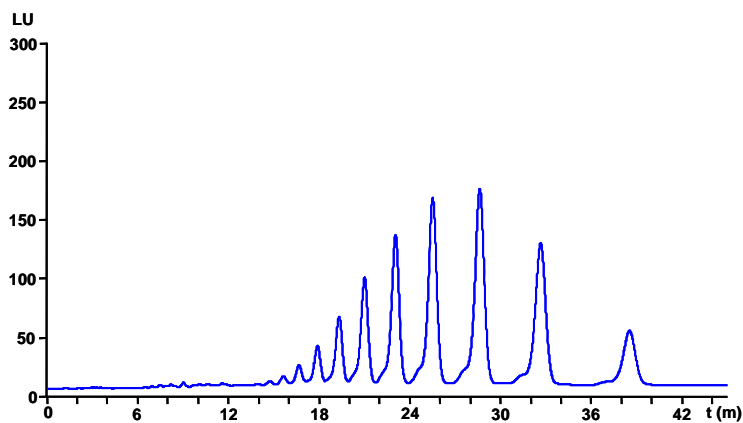


Figura 4.7 - Cromatograma obtenido empleando la fase móvil THF-H₂O en una proporción 35:65 (v/v).

Como se observa en la figura, con la variación introducida se obtiene una mayor resolución entre los picos cromatográficos. Sin embargo, el tiempo de análisis aumenta considerablemente, pasando de 8 a 40 minutos. Se decidió buscar una situación de compromiso entre resolución y tiempo de análisis, ensayando un porcentaje intermedio de THF (42.5 %). El cromatograma obtenido se muestra en la *Figura 4.8*.

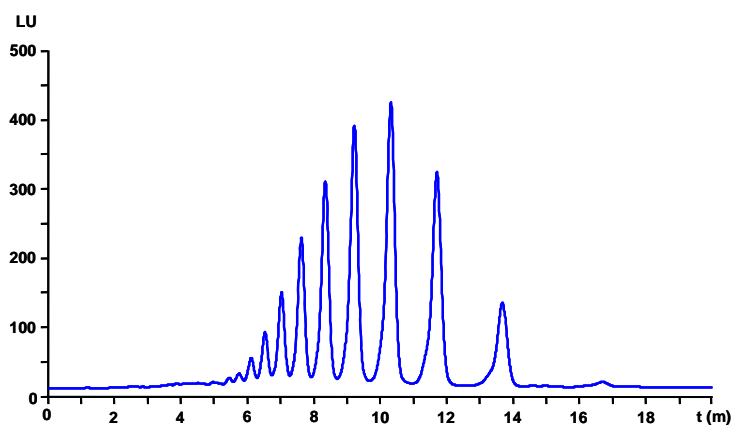


Figura 4.8 - Cromatograma obtenido empleando la fase móvil THF-H₂O en un porcentaje 42.5:57.5 (v/v).

En el cromatograma, se observa que la proporción THF:H₂O 42.5:57.5 v/v es una buena situación de compromiso entre resolución y tiempo de análisis. Por tanto, esta proporción fue la elegida como óptima para continuar con la optimización del método cromatográfico.

1.1.3 - Influencia del volumen de inyección

En este apartado se describe cómo afecta el volumen de inyección sobre la resolución y la sensibilidad. Para el estudio se eligió como referencia la pareja 4-*t*-OP₆EO y 4-*t*-OP₇EO. Se estudiaron volúmenes de inyección entre 5 y 50 µL.

En la **Tabla 4.6** se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 4.6 - Influencia del volumen de inyección.

Volumen de inyección	Resolución *	Área **
5 µL	1.00	2730
25 µL	0.99	14914
50 µL	0.99	29649

* Datos referidos al pico correspondiente al 4-*t*-OP₂EO

** Resolución referida a la pareja formada por 4-*t*-OP₆EO y 4-*t*-OP₇EO

Estos datos experimentales ponen de manifiesto que el volumen de inyección prácticamente no afecta a la resolución de los picos correspondientes al 4-*t*-OP₆EO y 4-*t*-OP₇EO. Se observa, sin embargo, un notable incremento en el área del pico correspondiente al 4-*t*-OP₂EO, siendo este resultado extrapolable al resto de picos cromatográficos. El aumento experimentado al pasar de 5 a 50 µL en el volumen de inyección

es de 10 veces lo cual implica un aumento sustancial en la sensibilidad del método ya que disminuiría el límite de detección en un orden de magnitud. Por tanto, se seleccionó como volumen de inyección un volumen de 50 μL .

1.1.4 - Influencia de la temperatura de la columna

Se estudió cómo afecta la variable temperatura de la columna a la resolución e intensidad de los picos cromatográficos.

En la **Tabla 4.7** se muestra la variación en el tiempo de retención y la resolución provocada por la modificación de la temperatura de la columna.

Tabla 4.7 - Tiempo de retención y resolución a diferentes temperaturas de trabajo.

T (°C)	Área*	t _r (min)*	Resolución**
20	10747.4	19.4	0.99
30	10853.7	16.3	0.99
40	10800.8	13.7	0.98

* Datos referidos al pico correspondiente al 4-*t*-OP₂EO

** Resolución referida a la pareja formada por 4-*t*-OP₆EO y 4-*t*-OP₇EO

Se observa que el aumento de la temperatura de columna no produce una disminución en el área de pico correspondiente al 4-*t*-OP₂EO, siendo esto extrapolable al resto de analitos. Con respecto a la resolución, la temperatura no ejerce una influencia significativa en la separación de los picos tomados como referencia.

En la **Figura 4.9** se muestran los cromatogramas obtenidos a cada una de las temperaturas ensayadas, para una disolución que contenía $54 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Igepal CA-520, $21 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Igepal CA-210, y $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cada uno de los alquilfenoles (4-*t*-OP, 4-*n*-OP y 4-*n*-NP) disueltos en THF-H₂O (50:50, v/v).

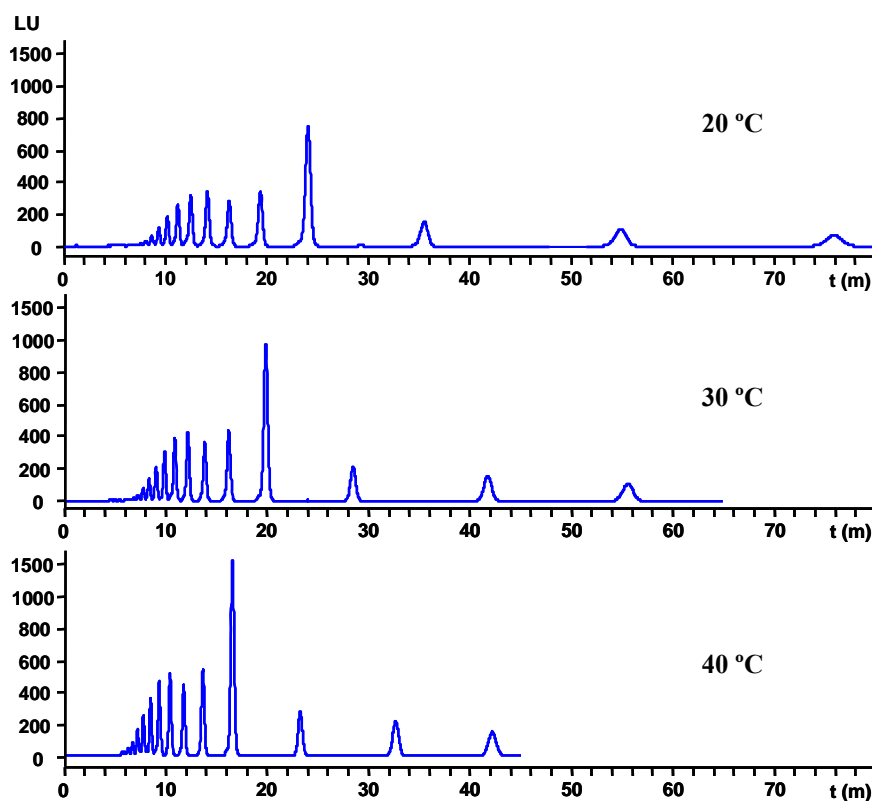


Figura 4.9 - Cromatogramas obtenidos a diferentes temperaturas.

Como se observa en la figura al aumentar la temperatura disminuye el tiempo de análisis, logrando acortarlo en más de 30 minutos cuando se emplea $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ en lugar de $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Se seleccionó 40 °C como temperatura de columna, dado que por una parte a esta temperatura parece no haber una desactivación no radiativa significativa de las moléculas de analito y por otra se obtiene una disminución notable en el tiempo de análisis.

1.1.5 - Resumen de las condiciones óptimas de trabajo

En la **Tabla 4.8** se recopilan los valores óptimos seleccionados para cada uno de los parámetros ensayados:

Tabla 4.8 - Resumen de los parámetros cromatográficos empleados para la determinación de AP y APEO.

Parámetros cromatográficos	
Columna	Lichrospher RP-C ₁₈
Fase móvil	THF-H ₂ O isocrático (42.5:57.5, v/v)
Flujo	1.0 mL·min ⁻¹
λ_{ex}	230 nm
λ_{em}	302 nm
Ganancia del fotomultiplicador	12
Temperatura de la columna	40 °C
Volumen de inyección	50 µL

En las **Figura 4.10** se muestra el cromatogramas correspondiente a la determinación de AP y APEO empleando las condiciones cromatográficas optimizadas.

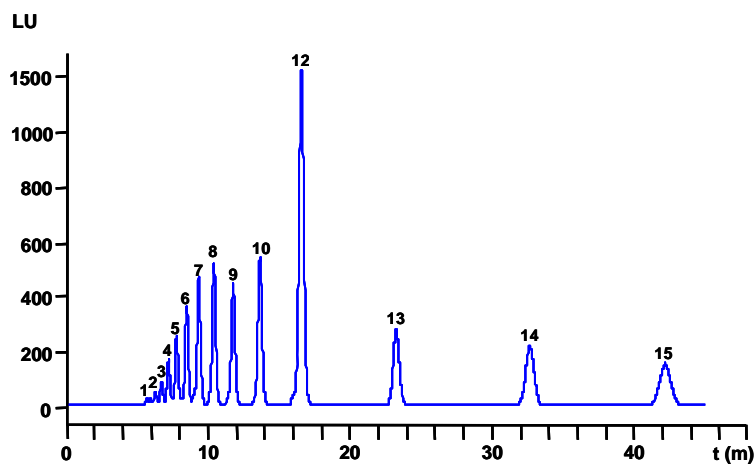


Figura 4.10 - Cromatograma obtenido con las condiciones cromatográficas optimizadas de la Tabla 4.8. Identificación de picos: (1) 4-t-OP₁₂EO (2) 4-t-OP₁₁EO; (3) 4-t-OP₁₀EO; (4) 4-t-OP₉EO; (5) 4-t-OP₈EO; (6) 4-t-OP₇EO; (7) 4-t-OP₆EO; (8) 4-t-OP₅EO; (9) 4-t-OP₄EO; (10) 4-t-OP₃EO; (11) 4-t-OP₂EO; (12) 4-t-OP₁EO; (13) 4-t-OP; (14) 4-n-OP; (15) 4-n-NP.

1.2 - Caracterización de las mezclas Igepal CA-210 e Igepal CA-520

Una vez establecido el método cromatográfico se llevó a cabo la caracterización de las mezclas de 4-*t*-OPEO (Igepal CA-520 e Igepal CA-210) usadas en este Capítulo. Previamente se comprobó que todos los constituyentes de la mezcla presentaban la misma relación entre su señal fluorescente y su señal de absorbancia para una misma concentración. Por tanto, se puede afirmar que el factor de respuesta de los compuestos respecto a la detección fluorescente es semejante para todos.

Para establecer la composición de las mezclas empleadas se prepararon tres disoluciones de cada una de ellas, de 21 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para el Igepal CA-210 y 54 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para el Igepal CA-520. Cada disolución se analizó por duplicado con las condiciones cromatográficas establecidas en el apartado

anterior y se integró el área de cada pico para establecer la proporción de cada componente en la mezcla teniendo en cuenta la riqueza en contenido total certificada por el fabricante.

Los resultados obtenidos, expresados como media de seis medidas, se muestran en las **Tablas 4.9** y **4.10**.

Tabla 4.9 - Composición de la mezcla Igepal CA-210.

Composición Igepal CA-210 (%)	
<i>4-t-OP₁EO</i>	76.82
<i>4-t-OP₂EO</i>	20.37
<i>4-t-OP₃EO</i>	2.14
<i>4-t-OP₅EO</i>	0.67
<i>Total</i>	100.0

Tabla 4.10 - Composición de la mezcla Igepal CA-520.

Composición Igepal CA-520 (%)	
<i>4-t-OP₁EO</i>	0.68
<i>4-t-OP₂EO</i>	8.54
<i>4-t-OP₃EO</i>	18.85
<i>4-t-OP₄EO</i>	22.58
<i>4-t-OP₅EO</i>	18.79
<i>4-t-OP₆EO</i>	13.35
<i>4-t-OP₇EO</i>	8.57
<i>4-t-OP₈EO</i>	4.76
<i>4-t-OP₉EO</i>	2.26
<i>4-t-OP₁₀EO</i>	0.98
<i>4-t-OP₁₁EO</i>	0.31
<i>4-t-OP₁₂EO</i>	0.34
Total	100.0

Debido a la baja proporción en que se encuentran los compuestos de mayor número de unidades etoxiladas los ensayos cuantitativos se han llevado a cabo considerando hasta el 4-*t*-OP₈EO.

1.3 - Optimización de las variables implicadas en el procedimiento de SPE

A continuación se desarrolla la optimización de la etapa de purificación y/o concentración empleando el procedimiento de extracción en fase sólida. En todos los casos se emplearon 100 mL de muestra acuosa que contenía $25 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de 4-*t*-OP, 4-*n*-NP, 4-*n*-OP; $24.8 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de la mezcla Igepal CA-210 y $108 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de la mezcla Igepal CA-520.

1.3.1 - Selección del tipo de adsorbente

Teniendo en cuenta el amplio intervalo de polaridades que abarcan los compuestos objeto de análisis se decidió testar dos tipos de adsorbentes: C₁₈ y ENV+. Las condiciones iniciales seleccionadas para cada uno de estos adsorbentes se presentan en la **Tabla 4.11**:

Tabla 4.11 - Condiciones iniciales de la SPE usando cartuchos C₁₈ y ENV+.

Etapa	Reactivos/condiciones
1) Acondicionamiento	7 mL MeOH + 3 mL H ₂ O
2) Carga	100 mL muestra acuosa
3) Secado	15 min
4) Elución	5 mL MeOH

Se llevó a cabo el análisis de las áreas de los picos cromatográficos. Para ello se comparó el área del pico correspondiente a cada analito tras el

proceso de SPE con el área de los mismos patrones sin ser sometidos a la SPE conteniendo la concentración que tendrían si la recuperación fuera del 100 %, con objeto de obtener el porcentaje de recuperación.

En la *Tabla 4.12* se muestran las recuperaciones obtenidas usando las condiciones iniciales de la *Tabla 4.11*.

Tabla 4.12 - Recuperación (%) usando las condiciones establecidas inicialmente.

Analito	Rec. (%) C ₁₈	Rec. (%) ENV+
4- <i>t</i> -OP	65.0	63.0
4- <i>n</i> -OP	51.3	60.0
4- <i>n</i> -NP	35.8	31.5
4- <i>t</i> -OP ₁ EO	90.4	90.0
4- <i>t</i> -OP ₂ EO	88.3	85.9
4- <i>t</i> -OP ₃ EO	79.9	53.1
4- <i>t</i> -OP ₄ EO	62.8	25.3
4- <i>t</i> -OP ₅ EO	48.4	23.8
4- <i>t</i> -OP ₆ EO	43.0	22.0
4- <i>t</i> -OP ₇ EO	40.0	20.0
4- <i>t</i> -OP ₈ EO	38.7	20.1

Se observa que ambos adsorbentes tienen un comportamiento similar para los cinco primeros compuestos, y se obtiene mejor comportamiento para el resto de los compuestos con los cartuchos de C₁₈. Sin embargo, en ninguno de los dos se consiguen recuperaciones satisfactorias para el 4-*n*-NP ni para los 4-*t*-OPEO de mayor polaridad.

Se estudió la causa de la baja recuperación para estos analitos, teniendo en cuenta dos hipótesis:

- Elución de los analitos en la etapa de carga.
- Baja efectividad de la etapa de elución, quedando por tanto los analitos retenidos en el adsorbente.

Para comprobar la primera hipótesis se introdujeron en el dispositivo de extracción de fase sólida, unos recipientes adecuados para recoger el volumen de carga. A continuación se llevaron a sequedad en rotavapor y se redisolviaron de la forma habitual para llevar a cabo el análisis mediante LC-FD. En los cromatogramas obtenidos al realizar este estudio con ambos cartuchos se comprobó que no aparecía ningún pico, verificándose de este modo que no se producía elución de analitos durante la etapa de carga del procedimiento de SPE.

Para comprobar la segunda hipótesis se realizó el procedimiento de SPE normal añadiendo una elución adicional de 5 mL de mezcla dietiléter-metanol (DEE-MeOH 90:10, v/v). Las recuperaciones obtenidas en la segunda elución con ambos adsorbentes aparecen en la **Tabla 4.13**.

Tabla 4.13 - Recuperaciones obtenidas en la segunda elución del procedimiento de SPE usando 5 mL de la mezcla DEE-MeOH (90:10, v/v).

Analito	Rec. (%) C ₁₈	Rec. (%) ENV+
4- <i>t</i> -OP	0.0	0.0
4- <i>n</i> -OP	0.0	13.0
4- <i>n</i> -NP	0.0	36.3
4- <i>t</i> -OP ₁ EO	0.0	1.7
4- <i>t</i> -OP ₂ EO	0.0	7.0
4- <i>t</i> -OP ₃ EO	0.0	40.0
4- <i>t</i> -OP ₄ EO	0.0	65.0
4- <i>t</i> -OP ₅ EO	0.0	62.0
4- <i>t</i> -OP ₆ EO	0.0	70.0
4- <i>t</i> -OP ₇ EO	0.0	74.0
4- <i>t</i> -OP ₈ EO	0.0	72.1

Se observa que la elución adicional con 5 mL de la mezcla DEE-MeOH (90:10, v/v) no provoca ningún efecto cuando se usa el adsorbente C₁₈. En el caso del adsorbente ENV+ se logran eluir los 4-*t*-OPEO de mayor polaridad consiguiendo también un aumento significativo en la recuperación del analito 4-*n*-NP.

Se comprobó así mismo, que una sola elución con 5 mL de la mezcla DEE-MeOH (90:10, v/v) era suficiente para obtener recuperaciones del mismo orden que las obtenidas con las dos eluciones (ver **Tabla 4.14**).

Se seleccionó el adsorbente ENV+ para seguir con la optimización del procedimiento de extracción en fase sólida puesto que las recuperaciones obtenidas al usar este adsorbente, entre el 63 y 95 %, con las condiciones ensayadas eran muy superiores a las obtenidas con el adsorbente C₁₈.

Tabla 4.14 - Recuperaciones (%) obtenidas con una sola elución consistente en 5 mL de la mezcla DEE-MeOH (90:10, v/v).

Analito	Rec. (%)	Analito	Rec. (%)
4- <i>t</i> -OP	62.5	4- <i>t</i> -OP ₄ EO	91.2
4- <i>n</i> -OP	74.0	4- <i>t</i> -OP ₅ EO	84.6
4- <i>n</i> -NP	71.4	4- <i>t</i> -OP ₆ EO	93.9
4- <i>t</i> -OP ₁ EO	90.3	4- <i>t</i> -OP ₇ EO	95.3
4- <i>t</i> -OP ₂ EO	92.4	4- <i>t</i> -OP ₈ EO	90.7
4- <i>t</i> -OP ₃ EO	94.6		

1.3.2 - Optimización de las etapas de carga y acondicionamiento

Debido a que el pH puede ejercer un papel importante en la eficiencia de extracción cuando se usan columnas ENV+, se procedió a investigar la influencia de esta variable en la etapa de carga y acondicionamiento. Para ello se adicionó 10 mL de disolución reguladora fosfato sódico/ácido fosfórico 50 mM a la carga sin alterar los 100 mL de volumen final de la misma. Además, los 5 mL de agua Milli-Q de la etapa de acondicionamiento se sustituyeron por 5 mL de disolución reguladora fosfato sódico/ácido fosfórico 5 mM. Se ensayaron valores de pH en la carga y acondicionamiento comprendidos entre 7.5 y 3.5 en intervalos de

1 unidad de pH y se compararon con los resultados obtenidos sin usar dicha disolución reguladora. Los datos se muestran en la **Tabla 4.15**.

Tabla 4.15 - Recuperaciones (%) en función del valor de pH de la disolución reguladora fosfato sódico/ácido fosfórico.

Analito	Ref	pH 3.5	pH 4.5	pH 5.5	pH 6.5	pH 7.5
4- <i>t</i> -OP	62.5	61.0	61.7	62.9	60.9	62.0
4- <i>n</i> -OP	74.0	73.5	73.0	74.3	72.8	72.5
4- <i>n</i> -NP	71.4	70.9	70.5	72.0	71.6	70.6
4- <i>t</i> -OP ₁ EO	90.3	90.0	89.4	89.0	90.p	91.1
4- <i>t</i> -OP ₂ EO	92.4	91.9	93.5	90.6	93.0	92.1
4- <i>t</i> -OP ₃ EO	94.6	94.2	93.4	94.9	95.0	92.9
4- <i>t</i> -OP ₄ EO	91.2	91.0	91.9	90.0	92.3	90.1
4- <i>t</i> -OP ₅ EO	84.6	84.9	84.0	85.9	84.3	83.9
4- <i>t</i> -OP ₆ EO	93.9	93.5	93.4	94.4	92.9	92.6
4- <i>t</i> -OP ₇ EO	95.3	95.0	95.9	94.3	94.8	95.6
4- <i>t</i> -OP ₈ EO	90.7	90.0	90.9	91.8	89.5	91.8

Los resultados demostraron que el control del pH mediante el uso de una disolución reguladora en las etapas de carga y acondicionamiento no afectaba de forma significativa a las recuperaciones de los analitos y por tanto su uso no era necesario.

El siguiente ensayo que se llevó a cabo fue introducir DEE en la primera etapa de acondicionamiento. El acondicionamiento se llevó a cabo con 5 mL de DEE seguidos de 5 mL de MeOH y por último 5 mL de agua Milli-Q para eliminar el exceso de disolvente orgánico. Se comprobó que había

cierta mejora en la línea base al incorporar el DEE. Por tanto, este fue el protocolo de acondicionamiento seleccionado.

A continuación se estudió cómo afectaba la composición de la carga a las recuperaciones obtenidas. Debido a que la carga del procedimiento de SPE está formada por el extracto obtenido en la etapa previa de extracción con disolventes presurizados, y que el MeOH es el disolvente empleado por excelencia para llevar a cabo estas extracciones, se decidió introducir metanol en la carga. Se ensayaron cargas con porcentajes de metanol comprendidas entre el 0 y el 100 %, verificando que las recuperaciones no variaban hasta llegar a un porcentaje de metanol en la carga del 40 %. Con porcentajes superiores al 40 % de metanol, las recuperaciones comenzaban a disminuir, probablemente por elución de los analitos durante la etapa de carga. El porcentaje de MeOH elegido fue de 35% para evitar variabilidad en la recuperación de los analitos atribuidas a pequeñas variaciones del porcentaje de MeOH en la carga..

1.3.3 - Optimización de la etapa de lavado

Con objeto de eliminar posibles interferentes que pudieran acompañar a los compuestos de interés, se introdujo una etapa de lavado en el procedimiento de SPE.

Se ensayaron lavados consistentes en 5 mL de agua Milli-Q con proporciones de metanol que cubrían el rango de 5 a 20 % en intervalos de 5 %. Los resultados obtenidos se recogen en la **Tabla 4.16**.

Tabla 4.16 - Recuperaciones (%) en función del porcentaje de MeOH en el agua de lavado.

Analito	sin MeOH	5 % MeOH	10 % MeOH	15 % MeOH	20 % MeOH
4-<i>t</i>-OP	62.0	61.5	62.3	61.9	62.2
4-<i>n</i>-OP	74.4	74.1	74.9	75.0	73.9
4-<i>n</i>-NP	71.8	70.2	71.4	72.9	71.4
4-<i>t</i>-OP₁EO	90.5	91.3	89.3	90.9	90.1
4-<i>t</i>-OP₂EO	92.3	90.4	93.4	91.4	92.0
4-<i>t</i>-OP₃EO	94.9	93.6	92.6	95.4	96.0
4-<i>t</i>-OP₄EO	92.0	91.1	93.7	90.2	92.7
4-<i>t</i>-OP₅EO	85.3	84.9	86.6	87.0	84.2
4-<i>t</i>-OP₆EO	92.8	93.5	93.9	91.7	92.6
4-<i>t</i>-OP₇EO	94.4	95.3	96.3	94.9	93.3
4-<i>t</i>-OP₈EO	91.6	90.7	92.5	90.1	92.3

Los resultados mostraron que no había pérdida de los analitos incluso realizando el lavado con agua Milli-Q conteniendo un 20 % de MeOH. Este fue el lavado seleccionado con el objetivo de eliminar el mayor número de interferentes posibles.

1.3.4 - Optimización de la etapa de secado

El siguiente paso fue evaluar cómo afectaba el tiempo de secado a la recuperación de los analitos y verificar si éste era necesario. Para ello, una vez completada la etapa de lavado, se dejaron secar los cartuchos a vacío

durante tiempos comprendidos entre 0 y 30 minutos. Los resultados obtenidos en este ensayo aparecen en la **Tabla 4.17**.

Tabla 4.17 - Recuperaciones (%) del procedimiento de SPE en función del tiempo de secado.

Analito	0 min	5 min	10 min	15 min	20 min	30 min
4-<i>t</i>-OP	58.2	60.3	61.1	62.6	58.4	54.7
4-<i>n</i>-OP	52.3	56.7	62.5	73.0	69.7	60.9
4-<i>n</i>-NP	58.1	59.2	61.9	70.6	68.0	55.7
4-<i>t</i>-OP₁EO	84.2	82.2	91.3	90.4	89.9	78.5
4-<i>t</i>-OP₂EO	81.4	82.2	93.0	93.9	94.3	94.0
4-<i>t</i>-OP₃EO	89.8	90.8	95.0	94.0	94.5	93.0
4-<i>t</i>-OP₄EO	82.1	88.2	89.5	90.0	91.0	86.0
4-<i>t</i>-OP₅EO	67.3	78.1	80.0	85.9	86.0	87.5
4-<i>t</i>-OP₆EO	73.3	78.1	86.1	92.2	92.0	89.3
4-<i>t</i>-OP₇EO	70.3	80.1	85.1	94.2	94.9	92.3
4-<i>t</i>-OP₈EO	70.2	78.0	87.8	92.0	92.7	90.2

Se observa un ligero aumento general de las recuperaciones al incrementar el tiempo de secado hasta 15 minutos. Tiempos superiores provocan una disminución en las recuperaciones de los analitos menos polares 4-*t*-OP, 4-*n*-NP, 4-*n*-OP y 4-*t*-OP₁EO. Este hecho podría deberse a una fuerte adsorción de estos analitos sobre el adsorbente del cartucho. Se seleccionó como óptimo para el procedimiento de SPE un tiempo de secado de 15 minutos.

1.3.5 - Selección del volumen de elución

Finalmente se estudió cómo afectaba el volumen de elución a las recuperaciones, ensayando tres valores: 3, 5 y 7 mL de la mezcla DEE-MeOH (90:10, v:v). Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 4.18**.

Tabla 4.18 - Recuperaciones (%) en función del volumen de elución empleado.

Analito	Rec (%) 3 mL	Rec (%) 5 mL	Rec (%) 7 mL
4- <i>t</i> -OP	55.3	62.0	61.1
4- <i>n</i> -OP	60.7	73.4	74.5
4- <i>n</i> -NP	62.5	70.9	71.9
4- <i>t</i> -OP ₁ EO	84.3	90.1	90.3
4- <i>t</i> -OP ₂ EO	85.1	92.9	93.0
4- <i>t</i> -OP ₃ EO	88.4	94.4	93.0
4- <i>t</i> -OP ₄ EO	85.6	91.3	90.5
4- <i>t</i> -OP ₅ EO	77.2	84.9	80.0
4- <i>t</i> -OP ₆ EO	84.6	93.4	94.1
4- <i>t</i> -OP ₇ EO	89.3	95.0	95.1
4- <i>t</i> -OP ₈ EO	81.2	90.9	91.3

Se verificó que las recuperaciones aumentaban al pasar de 3 a 5 mL de volumen de elución, permaneciendo sin cambios significativos a partir de este valor. El volumen de elución seleccionado fue el usado hasta ahora, 5 mL.

1.3.6 - Resumen de las condiciones óptimas del procedimiento de SPE

En la **Tabla 4.19** se recogen las condiciones optimizadas para la purificación y concentración de AP y APEO mediante el procedimiento de extracción en fase sólida.

Tabla 4.19. Condiciones óptimas del procedimiento de SPE para AP y APEO.

Etapa	Procedimiento	Reactivos/condiciones
Extracción en Fase Sólida con cartuchos ENV+	1) Acondicionamiento	5 mL DEE + 5mL MeOH + 5 mL H ₂ O
	2) Carga	100 mL hidrometanólica (H ₂ O:MeOH, 65:35, v/v)
	3) Lavado	5 mL H ₂ O-MeOH (80:20, v/v)
	4) Secado	15 min.
	5) Elución	5 mL DEE-MeOH (90:10, v/v)

1.4 - Optimización de las variables del procedimiento de PLE

La aparición de la técnica de extracción con disolventes presurizados (PLE) hace tan sólo unos años ha permitido llevar a cabo extracciones de analitos de muy diversa naturaleza de forma eficiente con la ventaja de reducir el tiempo de extracción y el volumen de disolvente consumido en la misma.

Las principales variables que afectan al procedimiento de PLE son la naturaleza del disolvente empleado, el tiempo de extracción y la temperatura de extracción. El valor de la presión no suele ejercer un efecto influyente, consistiendo su papel en mantener el disolvente de extracción en estado líquido a las elevadas temperaturas de trabajo.

El suelo empleado para llevar a cabo la optimización del procedimiento de PLE fue previamente analizado para verificar que se encontraba libre de los analitos objetos de estudio.

El procedimiento seguido para la optimización del procedimiento de PLE fue el siguiente:

- 1) Se pesan 5 gramos de suelo.
- 2) Se fortifica con 2 mL de disolución metanólica conteniendo $1.25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de 4-*t*-OP, 4-*n*-OP y 4-*n*-NP; $1.24 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Igepal CA-210 y $5.4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Igepal CA-520.
- 3) Se deja secar hasta la desaparición del volumen sobrenadante.
- 4) Se introduce en una estufa a 50 °C durante 4 horas.
- 5) Se deja enfriar hasta alcanzar temperatura ambiente, quedando la muestra de suelo así lista para ser cargada en la célula de extracción.

1.4.1 - Selección del disolvente de extracción

Teniendo en cuenta el amplio rango de polaridad que cubren los compuestos objeto de estudio se decidió ensayar con los siguientes disolventes: metanol, acetona, diclorometano (DCM) y hexano. Las condiciones iniciales, recogidas en la *Tabla 4.20*, se seleccionaron tomando como punto de apoyo la bibliografía consultada.

Tabla 4.20 - Condiciones iniciales seleccionadas para la extracción de AP y APEO mediante el procedimiento de PLE.

Variable	Valor
Pre calentamiento	2 min
Calentamiento	5 min
Flush	50 %
Purga	120 s
Presión	1000 psi
Temperatura	50 °C
Tiempo estático	5 min
Ciclos	1

Las recuperaciones obtenidas con cada uno de los disolventes empleados se presentan en la *Tabla 4.21*.

Tabla 4.21 - Recuperaciones (%) obtenidas en función del disolvente de extracción empleado, usando las condiciones de la Tabla 4.20.

Analito	Rec. (%) MeOH	Rec. (%) DCM	Rec. (%) Acetona	Rec. (%) Hexano
4-<i>t</i>-OP	34.8	32.9	47.6	29.4
4-<i>n</i>-OP	45.6	41.2	39.8	33.6
4-<i>n</i>-NP	57.7	51.3	46.7	33.4
4-<i>t</i>-OP₁EO	82.7	83.5	78.1	72.8
4-<i>t</i>-OP₂EO	94.1	91.2	83.2	70.6
4-<i>t</i>-OP₃EO	94.1	88.0	84.9	47.9
4-<i>t</i>-OP₄EO	94.6	83.5	80.8	9.7
4-<i>t</i>-OP₅EO	94.3	87.9	88.7	0.3
4-<i>t</i>-OP₆EO	88.8	79.7	65.1	0.0
4-<i>t</i>-OP₇EO	76.8	62.4	26.4	0.0
4-<i>t</i>-OP₈EO	74.2	60.4	23.0	0.0

Los disolventes no polares como el hexano no son efectivos para extraer los 4-*t*-OPEO con mayor número de unidades etoxiladas. Las mejores recuperaciones se obtienen usando metanol como disolvente de extracción excepto para el 4-*t*-OP, en cuyo caso la mayor recuperación se obtiene empleando acetona.

Antes de escoger el disolvente de extracción se estudió el efecto de usar la mezcla metanol-acetona (50:50, v/v) para llevar a cabo la extracción. Las recuperaciones que se obtuvieron fueron semejantes a las obtenidas empleando sólo metanol y puesto que éste es el disolvente que forma parte de la carga en el procedimiento de extracción en fase sólida, fue el elegido para continuar con la optimización del procedimiento de PLE.

1.4.2 - Optimización de la temperatura de extracción

El siguiente paso fue estudiar la influencia de la temperatura de extracción en las recuperaciones de los compuestos objeto de estudio. Se ensayaron 5 valores de temperatura: 50, 70, 90, 120 y 150 °C, siempre empleando metanol como disolvente de extracción y bajo las condiciones mostradas en la *Tabla 4.20*.

Los resultados obtenidos se muestran en la *Figura 4.11*.

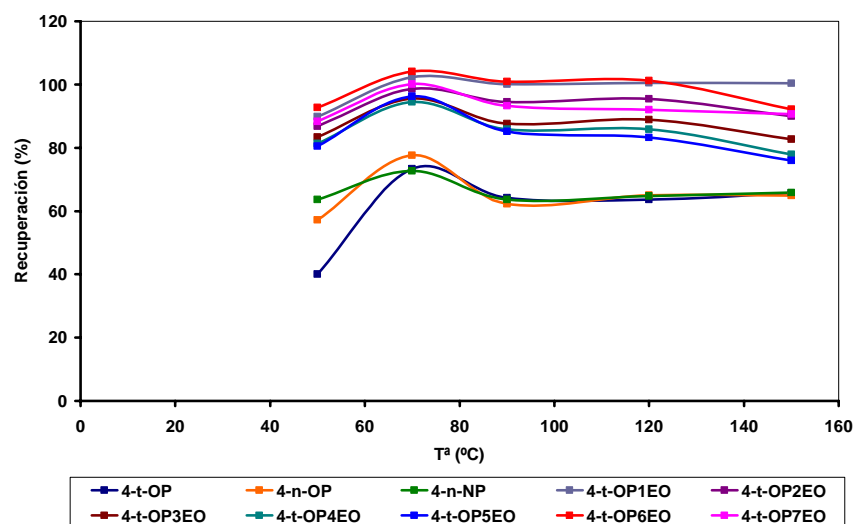


Figura 4.11 - Influencia de la temperatura de extracción en el procedimiento de PLE.

Se observa que las recuperaciones alcanzan un valor máximo a 70 °C. A partir de este valor un aumento de la temperatura de extracción conduce a una disminución de la recuperación obtenida, probablemente debido a la

degradación térmica de los analitos. Por tanto, la temperatura de extracción seleccionada fue 70 °C.

1.4.3 - Optimización del tiempo de extracción

A continuación se analizó la influencia que ejercía el tiempo de extracción sobre la recuperación de los analitos. Para ello se realizaron extracciones a seis tiempos de extracción: 1, 3, 5, 10, 15 y 20 minutos, todas ellas usando como disolvente metanol, como temperatura de extracción 70 °C y el resto de condiciones las que aparecen en la *Tabla 4.20*.

Los resultados obtenidos se muestran en la *Figura 4.12*.

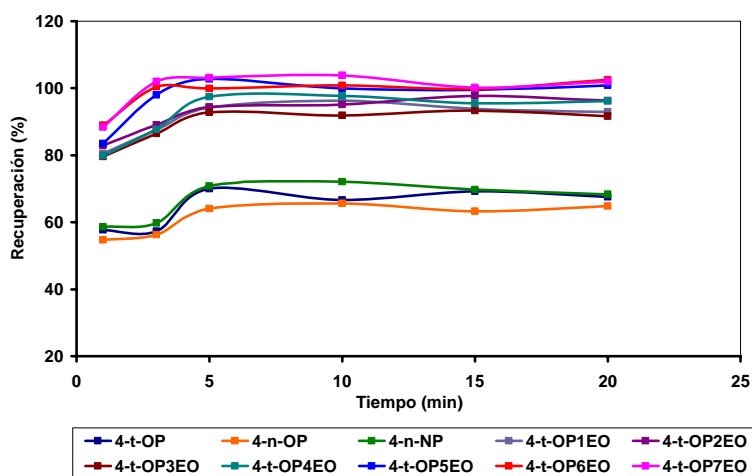


Figura 4.12 - Influencia del tiempo de extracción en el procedimiento de PLE.

Como se observa, para la mayoría de los analitos la recuperación aumenta al incrementar el tiempo de extracción hasta llegar al valor de 5 minutos.

A partir de este tiempo no hay variaciones significativas y por tanto, en orden a minimizar el tiempo empleado, se seleccionó 5 minutos como tiempo de extracción.

1.4.4 - Selección del número de ciclos

Se estudió la influencia del número de ciclos sobre la recuperación de los compuestos estudiados. Para ello se realizaron extracciones empleando 1, 2 y 3 ciclos, todas ellas utilizando los parámetros optimizados anteriormente (metanol como disolvente de extracción, temperatura 70 °C y tiempo de extracción 5 minutos) siendo el resto de condiciones son las que aparecen en la *Tabla 4.20*.

Los resultados revelaron que no había diferencias significativas en la recuperación al usar 1, 2 ó 3 ciclos. Se seleccionó el valor de un sólo ciclo para la extracción con objeto de minimizar así el tiempo empleado en el procedimiento de PLE.

1.4.5 - Influencia del secado del suelo en estufa y la adición de sustancias desecantes

A continuación se ensayó el efecto de secar el suelo en estufa o de adicionarle sustancias desecantes. Para ello se llevó a cabo la extracción de muestras de suelo secadas al aire; muestras secadas durante 4 horas en estufa a distintas temperaturas (50, 75 y 100 °C) y muestras de suelo secadas al aire y a las que se les adicionó una sustancia desecante.

Como desecante se ensayó el sulfato sódico anhidro y perlitas desecantes, pesando 2.5 gramos de cada uno de ellos y mezclándolos con los 5 gramos de suelo antes de introducirlos en la célula de extracción.

Las condiciones de extracción fueron las optimizadas a lo largo de los apartados anteriores y el resto de condiciones experimentales son las mostradas en la **Tabla 4.20**.

Los resultados de este experimento se muestran en la **Tabla 4.22**.

Tabla 4.22 - Influencia de la temperatura de secado en estufa y la adición de sustancias desecantes en el procedimiento de PLE.

Analito	Rec.(%) Estufa 50 °C	Rec.(%) Estufa 75 °C	Rec.(%) Estufa 100 °C	Rec.(%) 2.5 g perlitas	Rec.(%) 2.5 g Na ₂ SO ₄	Rec.(%) Secada al aire
4- <i>t</i> -OP	62	44	37	48	49	50
4- <i>n</i> -OP	65	60	49	63	61	62
4- <i>n</i> -NP	71	65	51	70	71	69
4- <i>t</i> -OP ₁ EO	92	91	90	86	88	87
4- <i>t</i> -OP ₂ EO	95	92	92	91	92	93
4- <i>t</i> -OP ₃ EO	97	94	93	92	93	93
4- <i>t</i> -OP ₄ EO	98	97	98	90	91	91
4- <i>t</i> -OP ₅ EO	95	96	94	88	84	87
4- <i>t</i> -OP ₆ EO	99	97	98	67	70	69
4- <i>t</i> -OP ₇ EO	97	96	97	58	59	59
4- <i>t</i> -OP ₈ EO	96	95	94	56	58	58

Se observa que las recuperaciones más elevadas se obtienen cuando las muestras de suelo son secadas en estufa a 50 °C. El aumento de la temperatura de secado provoca una disminución considerable en las recuperaciones del 4-*t*-OP, 4-*n*-OP y 4-*n*-NP, debido probablemente a la descomposición térmica de estos analitos. Con respecto a la adición de sustancias desecantes se puede concluir que no ejercen ningún efecto relevante, obteniéndose recuperaciones del mismo orden que cuando estas sustancias no son añadidas. Por tanto, su uso no es necesario.

Se optó por secar las muestras de suelo en estufa a 50 °C durante 4 horas (tiempo mínimo a partir del cual se obtiene un suelo seco, fácil de cargar en la célula de extracción) para conseguir la mayor recuperación posible.

1.4.6 - Resumen de las condiciones óptimas del procedimiento de PLE

En la **Tabla 4.23** aparecen las condiciones optimizadas para el procedimiento PLE empleadas posteriormente para la construcción de la función de calibración, validar el método y aplicarlo a muestras de suelo.

Tabla 4.23 - Condiciones óptimas del procedimiento de PLE.

Variable	Valor
Disolvente	MeOH
Pre calentamiento	2 min
Calentamiento	5 min
Flush	50 %
Purga	120 s
Presión	1000 psi
Temperatura	70 °C
Tiempo estático	5 min
Ciclos	1

1.5 - Procedimiento operatorio para el tratamiento de las muestras

El procedimiento operatorio seguido para el tratamiento de muestras de suelo es el que se indica a continuación:

Se pesan 5 gramos de suelo y se introduce en una estufa a 50 °C durante 4 horas con objeto de secar la muestra. Se deja enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente, quedando la muestra de suelo así lista para ser cargada en la célula de extracción.

Se introducen en la célula de extracción y se procede a la extracción con disolventes presurizados empleando metanol como agente extractante y aplicando las condiciones instrumentales descritas en la **Tabla 4.23**. El extracto metanólico obtenido, aproximadamente 45 mL, en el proceso de extracción se evapora en rotavapor hasta un volumen igual o menor a 35

mL. Se trasvasa a una probeta y se completa con el volumen necesario de metanol hasta 35 mL. A continuación se trasvasa a un matraz de 100 mL, completando el volumen con agua destilada. Estos 100 mL constituyen la carga hidrometanólica del procedimiento de SPE.

Tras llevar a cabo la SPE, el eluato obtenido se seca bajo corriente de nitrógeno a temperatura ambiente y se reconstituye a continuación con 100 μ L de tetrahidrofurano y 100 μ L de agua Milli-Q.

De esta forma, además de purificar la muestra, el procedimiento de SPE permite concentrar los analitos 500 veces (el volumen inicial es 100 mL y el final 200 μ L). A lo largo del tratamiento de muestra completo el factor de concentración de los analitos es 25, ya que se parte de 5 gramos de suelo y el volumen final del extracto es 200 μ L.

1.6 - Parámetros analíticos del método cromatográfico desarrollado.

A continuación se comentan los parámetros analíticos obtenidos a partir de los datos experimentales.

1.6.1 - Establecimiento y verificación del modelo

El modelo de calibración seleccionado fue el lineal de regresión univariante por mínimos cuadrados. Las curvas de calibrado se construyeron usando la relación entre el área de pico correspondiente del analito y la concentración del mismo.

Debido a que el Igepal CA-210 e Igepal CA-520 contienen constituyentes comunes en su composición, el proceso de calibración se llevó a cabo en dos pasos, el primero empleando los patrones 4-*t*-OP, 4-*n*-OP, 4-*n*-NP y la mezcla Igepal CA-210 y el segundo empleando la mezcla Igepal CA-520. En primer lugar se comprobó la existencia o no de efecto matriz comparando los datos obtenidos para un calibrado con patrones y otro con adición de patrón sobre la matriz objeto de estudio basado en un test estadístico de comparación de pendientes de dos funciones de calibrado.

Para establecer la curva de calibración con patrones, se dispuso una serie de matraces de 5.0 mL conteniendo concentraciones crecientes de los patrones en THF-H₂O (50:50, v/v). Se prepararon 6 niveles de concentración en el rango 2.5 a 100.0 µg·mL⁻¹ en el caso de los AP, de 2.48 a 99.2 µg·mL⁻¹ en el caso de la mezcla Igepal CA-210 y 7 niveles de concentración, de 10.8 a 540.0 µg·mL⁻¹, en el caso de la mezcla Igepal CA-520. De cada punto se realizaron tres réplicas experimentales y dos instrumentales. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 4.24 - Parámetros del calibrado con patrones de 4-*t*-OP, 4-*n*-OP, 4-*n*-NP y las mezclas Igepal CA-210 e Igepal CA-520.

Analito	b*	s _b	a	s _a	R ² (%)	s _{x/y}	P _{lof} **
4- <i>t</i> -OP	0.759	0.022	4.27	2.10	99.90	66.3	12.4
4- <i>n</i> -OP	0.807	0.012	3.50	1.14	99.88	53.3	10.2
4- <i>n</i> -NP	0.855	0.009	- 35.19	5.82	99.91	55.4	25.3
4- <i>t</i> -OP ₁ EO	1.267	0.051	- 13.23	3.56	99.92	49.7	15.7
4- <i>t</i> -OP ₂ EO	1.324	0.033	- 3.62	4.22	99.95	37.3	33.9
4- <i>t</i> -OP ₃ EO	0.786	0.025	42.24	8.72	99.92	23.5	42.9
4- <i>t</i> -OP ₄ EO	0.720	0.013	215.77	9.66	99.89	65.9	16.3
4- <i>t</i> -OP ₅ EO	0.695	0.062	34.31	7.34	99.80	53.8	8.9
4- <i>t</i> -OP ₆ EO	0.643	0.008	25.82	8.43	99.91	42.7	11.9
4- <i>t</i> -OP ₇ EO	0.585	0.064	1.33	5.23	99.92	67.6	12.5
4- <i>t</i> -OP ₈ EO	0.437	0.007	18.04	2.13	99.81	19.5	10.75

*b: expresado en ng·mL⁻¹; ** P_{lof}: Expresado en %.

Para las muestras de suelo, al igual que para los patrones, el calibrado del Igepal CA-210 e Igepal CA-520 se realizaron por separado.

Las funciones de calibración se establecieron siguiendo el procedimiento que se describe a continuación:

Se prepararon una serie de tubos, pesando 5.0 gramos de suelo y se fortificó el día anterior al análisis (aproximadamente 24 horas antes). Se dejó secar al aire el volumen sobrenadante y a continuación se introdujo

en la estufa a 50 °C durante 4 horas. Para cada AP y la mezcla Igepal CA-210 se prepararon 6 niveles de concentración (100.0, 200.0, 400.0, 1200.0, 2000.0, 4000.0 ng·g⁻¹ en el caso de los AP; y 99.2, 198.4, 396.8, 1190.4, 1984.0 y 3968.0 ng·g⁻¹ en el caso de la mezcla Igepal CA-210). Para la mezcla Igepal CA-520 se prepararon 7 niveles de concentración (432.0, 864.0, 2592.0, 4320.0, 8640.0, 17280 y 21600.0 ng·g⁻¹). Cada una de las concentraciones se preparó por triplicado y cada punto se analizó por duplicado.

Se siguieron los procedimientos de extracción con disolventes presurizados, extracción en fase sólida y cromatográficos anteriormente descritos.

La curva de calibración se construyó utilizando el área de analito frente a concentración del mismo. Los parámetros estadísticos del modelo para el método de determinación de AP y APEO en suelos, se describen en la **Tabla 4.25**.

Comparando los resultados de las **Tablas 4.25 y 4.24** se aprecia que las pendientes de las curvas de calibración con la matriz son inferiores a las pendientes del calibrado con patrones, teniendo en cuenta que en el tratamiento de muestra, ésta es concentrada 25 veces.

Tabla 4.25 - Parámetros estadísticos de la determinación de AP y APEO en suelo.

Analito	b*	S _b	a	S _a	R ² (%)	S _{x/y}	P _{lof} **
4-t-OP	15.18	0.134	53.29	0.235	99.92	0.224	9.50
4-n-OP	15.97	0.131	17.70	0.230	99.93	0.314	6.44
4-n-NP	16.43	0.082	- 415.9	0.143	99.97	0.172	10.87
4-t-OP₁EO	25.80	0.195	- 249.0	0.145	99.95	0.276	23.83
4-t-OP₂EO	26.15	0.157	- 51.6	0.056	99.96	0.298	10.87
4-t-OP₃EO	15.80	0.131	622.2	0.232	99.93	0.333	22.14
4-t-OP₄EO	14.39	0.110	915.7	0.252	99.95	0.156	8.62
4-t-OP₅EO	14.15	0.117	254.3	0.206	99.93	0.274	35.49
4-t-OP₆EO	13.88	0.095	475.9	0.128	99.96	0.198	14.30
4-t-OP₇EO	11.77	0.129	4.5	0.112	99.90	0.491	14.49
4-t-OP₈EO	7.71	0.087	336.0	0.042	99.89	0.185	8.75

*b: expresado en $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$; **P_{lof}: Expresado en %.

Al comparar las pendientes se comprobó que había diferencia significativa para todos los compuestos estudiados. También se constató que las ordenadas eran significativamente diferentes por lo cual, para cada compuesto, había dos rectas de calibrado diferentes y no paralelas poniendo de manifiesto la existencia de efecto matriz. Según lo dicho, la cuantificación de AP y APEO en suelo agrícola se llevó a cabo usando las funciones de calibración obtenidas con muestras fortificadas.

Para la verificación del modelo, se tuvieron en cuenta dos parámetros:

- 1) *Evaluación del fallo de ajuste (P_{Lof})*: para determinar la tendencia lineal de los datos. En la **Tabla 4.25** se observa que en todos los casos el valor P obtenido es mayor del 5 %, por tanto se concluye que no existe curvatura, es decir, los datos se ajustan al modelo lineal seleccionado.

- 2) *Evaluación de la condición de homocedasticidad*, es decir, homogeneidad de varianzas. Para esta finalidad se empleó el análisis gráfico de los residuos, observándose que se cumplían las premisas fijadas en todos los casos. Por tanto, se puede afirmar que los datos son homocedásticos.

1.6.2 - Parámetro de calidad del método analítico

1.6.2.1 - Límite de detección y cuantificación

Para el cálculo de estos parámetros se utilizó la metodología basada en la recta de calibrado, desarrollada en la opción **b** del apartado **5.3.4** del **Capítulo Experimental: Materiales y Métodos**.

Los resultados se muestran en la **Tabla 4.26**.

Tabla 4.26 - Límites de detección y cuantificación para la determinación de APEO y AP en suelos.

Analito	LD (ng·g ⁻¹)	LQ (ng·g ⁻¹)
4- <i>t</i> -OP	25	82
4- <i>n</i> -OP	31	104
4- <i>n</i> -NP	19	63
4- <i>t</i> -OP ₁ EO	27	89
4- <i>t</i> -OP ₂ EO	6	20
4- <i>t</i> -OP ₃ EO	31	102
4- <i>t</i> -OP ₄ EO	60	200
4- <i>t</i> -OP ₅ EO	41	140
4- <i>t</i> -OP ₆ EO	32	107
4- <i>t</i> -OP ₇ EO	33	111
4- <i>t</i> -OP ₈ EO	35	114

1.6.2.2 - Rango dinámico lineal y Linealidad

En la **Tabla 4.27** se muestran los valores obtenidos para el Rango Dinámico Lineal (RDL), la Linealidad (LIN), la Desviación Estándar Relativa (DER) y la Sensibilidad analítica ($S_{\text{analítica}}$).

Tabla 4.27 - Determinación de los parámetros RDL, LIN on line, DER y S_{anal} para la determinación de AP y APEO en suelo.

Analito	RDL (ng·g ⁻¹)	LIN (%)	DER (%)	S_{anal} (ng·g ⁻¹)
4- <i>t</i> -OP	81-4000	99.12	0.88	76.81
4- <i>n</i> -OP	104-4000	99.18	0.82	71.32
4- <i>n</i> -NP	63-4000	99.50	0.50	43.23
4- <i>t</i> -OP ₁ EO	88-1536	99.24	0.76	24.88
4- <i>t</i> -OP ₂ EO	20-815	99.40	0.60	10.68
4- <i>t</i> -OP ₃ EO	102-4072	99.40	0.60	73.39
4- <i>t</i> -OP ₄ EO	200-4877	99.24	0.76	76.70
4- <i>t</i> -OP ₅ EO	140-4059	99.18	0.82	72.76
4- <i>t</i> -OP ₆ EO	106-2883	99.32	0.68	40.23
4- <i>t</i> -OP ₇ EO	111-1850	98.90	1.10	41.77
4- <i>t</i> -OP ₈ EO	113-1027	98.87	1.13	23.94

En todos los casos la linealidad “on line” es superior al 95 %. Se puede, por tanto, afirmar que los datos experimentales se ajustan al modelo lineal propuesto.

1.6.2.3 - Recuperación y Precisión

Con el fin de evaluar la precisión del método analítico se estimó la repetibilidad intra- e inter- día. Para ello se llevaron a cabo dos experiencias: la primera para hallar la repetibilidad intra- e inter- día de AP y 4-*t*-OPEO de 1 y 2 unidades etoxiladas, empleando los patrones de los correspondientes AP y la mezcla Igepal CA-210 y la segunda para

hallar la repetibilidad intra- e inter- día de los 4-*t*-OPEO que contienen de 3 a 8 unidades etoxiladas, empleando para ello la mezcla Igepal CA-520.

En la primera experiencia se fortificaron muestras de suelo libre de los analitos a tres niveles de concentración de 4-*t*-OP, 4-*n*-OP, 4-*n*-NP e Igepal CA-210 (200.0, 1000.0 y 2000.0 ng·g⁻¹ en el caso de los AP; y 198.4, 992.1 y 1983.9 ng·g⁻¹ en el caso del Igepal CA-210) y se analizó por triplicado. Este procedimiento se repitió cada uno de los 3 días que duró el estudio. De la misma forma se realizó la segunda experiencia, fortificando muestras de suelo libres de los analitos a tres niveles de concentración (1296.0, 6912.0 y 13824 ng·g⁻¹) de Igepal CA-520.

Las muestras se trataron mediante el procedimiento de extracción con disolventes presurizados y de extracción en fase sólida ya descritos con anterioridad y se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos fijando las condiciones instrumentales habituales.

La recuperación se evaluó comparando las áreas de muestras fortificadas con áreas proporcionadas por muestras de suelo no fortificadas que fueron sometidas a todo el proceso (extracción, purificación y preconcentración) añadiendo el correspondiente patrón después de la evaporación del eluato obtenido en el procedimiento de SPE.

Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 4.28**.

Tabla 4.28 - Recuperaciones (%) intra e inter día y precisión (DER, %)*

Analito	Recuperación (%) y precisión (DER, %)			
	Nivel	1	2	3
4- <i>t</i> -OP	200.0	62 (2)	63 (2)	63 (3)
	1000.0	61 (2)	60 (4)	62 (4)
	2000.0	62 (4)	63 (3)	62 (3)
4- <i>n</i> -OP	200.0	64 (2)	62 (3)	63 (4)
	1000.0	64 (4)	65 (3)	62 (3)
	2000.0	63 (3)	62 (4)	64 (3)
4- <i>n</i> -NP	200.0	72 (3)	70 (3)	69 (2)
	1000.0	69 (3)	69 (4)	71 (3)
	2000.0	71 (4)	72 (4)	69 (3)
4- <i>t</i> -OP ₁ EO	152.4	92 (2)	90 (3)	89 (2)
	762.1	93 (3)	92 (3)	91 (4)
	1524.0	91 (4)	93 (4)	92 (3)
4- <i>t</i> -OP ₂ EO	40.4	94 (3)	93 (2)	91 (2)
	202.1	95 (4)	94 (3)	92 (4)
	404.0	94 (3)	92 (4)	93 (4)
4- <i>t</i> -OP ₃ EO	244.3	96 (3)	97 (2)	98 (3)
	1302.9	94 (3)	95 (2)	98 (4)
	2605.9	99 (4)	100 (4)	98 (3)
4- <i>t</i> -OP ₄ EO	296.1	98 (3)	100 (2)	99 (3)
	1579.2	100 (4)	96 (2)	98 (4)
	3158.4	96 (4)	94 (3)	98 (4)
4- <i>t</i> -OP ₅ EO	243.5	98 (3)	99 (3)	101 (3)
	1298.7	98 (3)	97 (3)	100 (4)
	2597.3	99 (4)	97 (3)	98 (3)
4- <i>t</i> -OP ₆ EO	173.0	94 (2)	95 (4)	97 (3)
	922.6	96 (4)	98 (3)	95 (3)
	1845.3	94 (4)	97 (3)	98 (4)
4- <i>t</i> -OP ₇ EO	111.0	96 (2)	96 (3)	99 (3)
	592.0	100 (4)	96 (4)	99 (2)
	1184.0	96 (4)	98 (4)	100 (4)
4- <i>t</i> -OP ₈ EO	328.8	99 (4)	96 (4)	97 (3)
	657.5	98 (4)	101 (4)	99 (4)

* Media de tres determinaciones. DER (%): desviación estándar relativa.

Del 4-*t*-OP₈EO se dispone sólo de 2 valores de concentración porque una de las concentraciones se encontraba fuera del rango dinámico lineal calculado anteriormente.

Se observa que, en todos los casos, la desviación estándar relativa es menor del 10 % y se puede concluir que el método propuesto suministra resultados muy próximos entre sí y, por lo tanto, cumple con los requisitos de precisión

1.6.2.4 - Sensibilidad o Resolución analítica

De acuerdo con los datos experimentales obtenidos, las resoluciones analíticas calculadas para cada componente se expresan la **Tabla 4.27**.

1.7 - Validación del método cromatográfico desarrollado

La validación de la metodología propuesta para la determinación de AP y APEO por LC-FD se llevó a cabo mediante un estudio de recuperación. Por tanto, se usaron muestras suelo (procedente de la zona no saturada de la parcela agrícola de la Vega de Granada) libres de los analitos objeto de estudio. Las muestras se prepararon usando 5 gramos de suelo fortificado en los mismos niveles de concentración que los que se emplearon para el calibrado. El suelo se sometió a los procesos de extracción/purificación/concentración necesarios. El estudio se llevó realizando tres réplicas experimentales y dos réplicas instrumentales de cada nivel de concentración.

Los valores medios obtenidos se presentan en la **Tabla 4.29**.

Tabla 4.29 - Veracidad del método para la determinación de AP y APEO.

Analito	Veracidad				
	Conc. añadida (ng·g ⁻¹)	Conc. encontrada (ng·g ⁻¹)	Rec. (%)	t _{calc.}	P (%)
4-<i>t</i>-OP	200.0	202.5 ± 2.9	101	2.11	9
	400.0	408.8 ± 9.1	102	2.37	6
	800.0	785.5 ± 16.2	98	3.19	8
	1500.0	1515.8 ± 28.6	101	1.35	23
	3000.0	2950.7 ± 54.8	98	2.20	8
4-<i>n</i>-OP	200.0	198.0 ± 2.8	99	1.74	14
	400.0	393.8 ± 8.2	98	1.85	12
	800.0	812.2 ± 15.3	102	1.95	11
	1500.0	1480.3 ± 26.7	99	1.81	13
	3000.0	3060.6 ± 64.9	102	2.29	7
4-<i>n</i>-NP	200.0	197.5 ± 3.1	99	1.97	11
	400.0	390.6 ± 11.4	97	2.01	10
	800.0	819.4 ± 21.3	102	2.23	8
	1500.0	1530.5 ± 35.6	102	2.10	9
	3000.0	2948.4 ± 60.5	98	2.10	9
4-<i>t</i>-OP₁EO	152.4	155.8 ± 4.1	102	2.03	10
	304.8	314.2 ± 12.1	103	1.90	12
	609.6	591.5 ± 21.3	97	2.08	9
	1143.0	1190.8 ± 50.5	104	2.32	7
4-<i>t</i>-OP₂EO	46.0	47.5 ± 1.8	103	2.04	10
	92.0	89.2 ± 3.2	97	2.14	9
	184.0	179.0 ± 6.2	97	1.98	11
	345.0	354.8 ± 13.4	103	1.79	13
	690.0	671.6 ± 25.7	97	1.75	14

Tabla 4.29 - Veracidad del método para la determinación de AP y APEO.(cont.)

Analito	Veracidad				
	Conc. añadida (ng·g ⁻¹)	Conc. encontrada (ng·g ⁻¹)	Rec. (%)	t _{calc.}	P (%)
4- <i>t</i> -OP ₃ EO	244.3	248.2 ± 4.1	102	2.33	7
	325.7	319.6 ± 8.1	98	1.84	12
	651.5	638.7 ± 15.3	98	2.05	10
	1302.9	1339.4 ± 42.5	103	2.10	9
	2605.9	2549.2 ± 62.8	98	2.21	8
4- <i>t</i> -OP ₄ EO	296.1	294.1 ± 7.2	98	0.68	53
	394.8	402.6 ± 10.5	102	1.82	13
	789.6	810.6 ± 25.1	103	2.04	10
	1579.2	1515.3 ± 75.7	96	2.07	9
	3158.4	3250.1 ± 106.8	103	2.10	9
4- <i>t</i> -OP ₅ EO	243.5	243.3 ± 5.2	100	0.09	93
	324.7	315.6 ± 12.3	97	1.81	13
	649.3	620.7 ± 34.1	96	2.05	10
	1298.7	1350.3 ± 60.2	104	2.09	9
	2597.3	2480.6 ± 125.6	96	2.27	7
4- <i>t</i> -OP ₆ EO	173.0	169.8 ± 3.9	98	2.01	10
	230.7	237.9 ± 8.4	103	2.10	9
	461.3	447.7 ± 15.1	97	2.20	8
	922.6	903.1 ± 25.2	98	1.89	12
	1845.3	1834.7 ± 58.6	99	0.44	68
4- <i>t</i> -OP ₇ EO	111.0	115.6 ± 4.8	104	2.35	7
	148.0	153.1 ± 6.9	103	1.40	22
	296.0	288.7 ± 10.6	97	1.69	15
	592.0	590.8 ± 21.2	100	0.14	90
	1184.0	1220.6 ± 45.8	103	1.96	11

Tabla 4.29 - Veracidad del método para la determinación de AP y APEO.(cont.)

Analito	Veracidad				
	Conc. añadida (ng·g ⁻¹)	Conc. encontrada (ng·g ⁻¹)	Rec. (%)	t _{calc.}	P (%)
4- <i>t</i> -OP ₈ EO	164.4	159.7 ± 5.5	97	2.09	9
	328.8	317.6 ± 13.5	97	2.03	10
	657.5	685.7 ± 30.1	104	2.29	7

Para el 4-*t*-OP₁EO y 4-*t*-OP₈EO no se han podido determinar los 5 niveles de concentración por no encontrarse el valor de la concentración dentro de sus respectivos rangos dinámicos lineal.

A continuación, la validación del método para estas muestras de suelo se llevó a cabo usando el test de la **t-Student** de comparación de una media experimental con un valor conocido. Los valores de t_{calc.}, como se puede ver en la **Tabla 4.29**, fueron en todos los casos inferiores a los valores de t_{tab.}, resultando en la aceptación de la hipótesis nula (no hay diferencia significativas entre las concentraciones encontradas y las añadidas), demostrándose con esto que el método desarrollado produce resultados veraces.

2.- DESARROLLO DE METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE AP Y APEO MEDIANTE GC-MS.

El objetivo es establecer una metodología analítica para la determinación de AP y APEO en muestras de suelo mediante cromatografía de gases acoplada con la espectrometría de masas (CG-MS). Como se comentó en el **apartado 1** de este Capítulo, se requiere de una etapa previa de extracción de los analitos y una etapa de purificación y preconcentración. En este caso también es necesaria la introducción de una etapa de derivatización de los analitos para su posterior separación y determinación mediante GC-MS.

Es posible determinar sin necesidad de reacción de derivatización AP y APEO con un máximo de 2 ó 3 unidades etoxiladas. Los APEO con un número de unidades etoxiladas superior a 3 son poco volátiles y por tanto con estos analitos la etapa de derivatización se hace imprescindible. Por regla general, el empleo de este tipo de reacciones produce una mejora en las características cromatográficas de los derivados originados, ya que presentan una mayor volatilidad, polaridad y estabilidad térmica, lo que hace más fácil su determinación mediante cromatografía de gases.

Puesto que las etapas de extracción y purificación ya se encuentran desarrolladas en los **apartados 1.2** y **1.3** de este Capítulo, este apartado se centrará únicamente en las etapas de derivatización y detección.

2.1 - Parámetros instrumentales del espectrómetro de masas

El espectrómetro de masas nos permite dos modos diferentes de trabajo: modo SCAN (barrido) y modo SIM (monitorización de los iones seleccionados). A continuación se comentan brevemente los parámetros que controlan ambos modos.

2.1.1 - Análisis en modo SCAN

El modo Scan consiste en la realización de un barrido lineal por parte del detector en un rango de m/z previamente seleccionado por el operador, obteniéndose espectros de masas completos dentro de ese rango. Las medidas de la abundancia de los iones en función de la relación m/z se realizan de forma discontinua en intervalos de valor 0.125 m/z . Si la abundancia del ión es mayor de un valor prefijado (valor umbral de detección) el dato es almacenado en la memoria del ordenador y al final del barrido se tiene un espectro de masas completo que se traduce en un punto del cromatograma. Al cabo de un tiempo, denominado tiempo de barrido, se inicia un nuevo barrido que conduce a la obtención de un nuevo espectro de masas y por tanto a un nuevo punto del cromatograma.

Otros parámetros importantes a tener en cuenta del espectrómetro de masas y que afectan a la señal analítica son:

- *Rango masa/carga del espectro de masas.* Este parámetro viene dado por los valores superior e inferior del espectro de masas de trabajo. El rango a estudiar debe ser seleccionado para hacerlo coincidir con la zona que genera mayor información analítica sin

ampliarlo innecesariamente ya que aumentaría el tiempo de barrido y bajaría la calidad de la señal analítica. El límite inferior a ser posible debe evitar las masas 18, 28, 32 y 34 correspondientes a H₂O, N₂, O₂ y CO₂, respectivamente, ya que la presencia de trazas de humedad o de aire, produciría un ruido de fondo en el cromatograma que afectaría a la reproducibilidad del mismo. Se seleccionó para nuestro estudio un valor mínimo de 50 m/z. El rango superior seleccionado para el estudio de AP y APEO fue 1000, valor que alcanza holgadamente los pesos moleculares de los compuestos estudiados.

- *Número de medidas de cada ión.* Es el número de veces que el detector mide la abundancia de una masa particular con objeto de tener un valor medio más exacto de las medidas realizadas. El número de medidas realizadas es 2^N , donde N vale entre 0 y 7. Si N es elevado, el tiempo de barrido también lo es, perdiéndose definición en el pico cromatográfico. Si por el contrario el valor es pequeño, el cromatograma estará bien definido por muchos puntos pero poco precisos. En esta Memoria se utilizó un valor de N=3, con lo que el número de medidas fue 8.
- *Voltaje del electro-multiplicador.* La señal generada por el detector es proporcional a la concentración de analito y a la amplificación de la señal que viene dada por el voltaje aplicado al electrón multiplicador. Este parámetro es ajustado automáticamente por el equipo, modificando para ello automáticamente el voltaje hasta conseguir que la abundancia del ion m/z 69 de la perfluorotributilamina sea aproximadamente

250.000; de este modo, a medida que disminuye la sensibilidad del detector aumenta paralelamente el voltaje para que la señal analítica sea constante y reproducible.

- *Valor umbral de detección (Scan Threshold)*. Es la menor abundancia que debe poseer un ión determinado para que sea considerado como existente. El valor umbral seleccionado a lo largo de esta Memoria para el voltaje habitual del electro-multiplicador fue 200.
- *Solvent Delay*. El detector debe desconectarse durante el tiempo en el que el disolvente pasa por él. Si el detector se mantuviese conectado, se saturaría la fuente de ionización al llegar una gran cantidad de moléculas de disolvente, provocando una disminución drástica del vacío e incluso daños tanto en el filamento encargado de generar los electrones ionizantes como en el medidor de vacío. El “solvent delay” empleado en los métodos para la detección de AP y APEO fue de 5 minutos.

2.1.2 - Análisis en modo SIM (Selected Ion Monitoring).

Cuando se selecciona en el espectrómetro de masas este modo, solo se miden unos determinados iones previamente seleccionados por el operador, en lugar de realizar un barrido completo como en el caso del modo Scan. Esta modalidad de trabajo ofrece una serie de ventajas, como son:

- *Disminuye el tiempo de barrido*, ya que sólo se mide la abundancia de determinados iones.
- *Aumenta la precisión de las medidas respecto al modo Scan*, ya que al ser mayor el número de veces que se repite la medida para un ión, ésta será mas precisa. Al ser menor el número de iones a medir, es posible realizar muchas medidas repetitivas con un tiempo de barrido corto. Por otra parte, como la señal medida es suma de las abundancias de los iones seleccionados para el análisis, existe menor probabilidad de que en esta suma se incluyan abundancias de otros iones que aleatoriamente se encuentren en el detector.
- *Mejor definición del pico cromatográfico*. En modo SIM éste viene definido por un número de puntos mayor al ser el tiempo de barrido menor. Por tanto será mayor la precisión en la medida del área.
- *Mayor sensibilidad analítica*. Aunque la pendiente del calibrado es mayor en modo Scan, la desviación estándar del calibrado (s_{xy}) en modo SIM es menor, por tanto el cociente entre ambas lo será también.
- *Mejora la selectividad de la determinación* en el caso de compuestos eluidos con el mismo tiempo de retención. Esto es debido a que el detector sólo mide los fragmentos característicos del componente de interés, eliminando por completo las posibles

interferencias causadas por fragmentos comunes de otros compuestos que coeluyan con el analito de interés.

La mayor parte de los parámetros fijados en modo de trabajo Scan, coinciden con los utilizados en modo SIM, aunque éste necesita además de algunos otros parámetros específicos como son:

- *Iones seleccionados para el análisis.* Se debe tener en cuenta dos factores: por una parte, se seleccionarán los fragmentos del compuesto que tengan una abundancia relativa mayor, y en segundo lugar, si alguno de estos fragmentos seleccionados fuera común a un posible interferente, descartaríamos el fragmento común analito-interferente.

Se deben seleccionar no menos de dos iones, pero no más de seis, ya que no generaría ningún beneficio añadido. Es bastante aceptado el criterio de seleccionar tres iones característicos del compuesto o los más abundantes, siempre que sea posible. En esta Memoria se han seleccionado entre dos y tres fragmentos.

- *Tiempo de inicio del análisis de cada ión.* Se estableció el momento de inicio de lectura de cada uno de los iones en función del tiempo de retención de cada compuesto en el cromatograma en modo SCAN.
- *Tiempo de medida de cada ión (Dwell).* Es el tiempo que se mide un ión antes de pasar al siguiente. En esta Memoria se ha utilizado un tiempo de 100 ms como tiempo de medida para cada ión.

2.2 - Derivatización de compuestos hidroxilados. Silanización.

El empleo de reacciones de derivatización en química analítica permite transformar compuestos poco estables térmicamente, no volátiles o poco volátiles en derivados que sí lo son.

Uno de los procedimientos más utilizados para la derivatización de compuestos orgánicos que poseen grupos -OH, -NH o -SH es la silanización. En esta reacción el átomo de hidrógeno activo es reemplazado por un grupo alquilsilil ($R_3\text{-Si-}$). El mecanismo implicado parece ser un ataque nucleofílico sobre el átomo de silicio que requiere, por tanto, un grupo saliente (X) de baja basicidad, con capacidad para estabilizar una carga negativa en el estado de transición y que forme un enlace no muy fuerte con el átomo de silicio⁶. Los primeros reactivos de silanización empleados fueron el trimetilclorosilano y el hexametildisilazano y, aunque aún se siguen utilizando, en los últimos años se han desarrollado un gran número de nuevos reactivos. En la **Tabla 4.30** se muestran algunos de ellos.

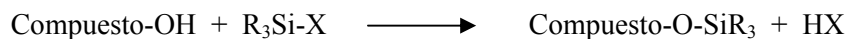
⁶ McCallum N.K. and Armstrong R.J., *The derivatisation of phenols for gas chromatography using electron capture detection*. J. Chrom. A 78; 303-307, (1973).

Tabla 4.30 - Reactivos de silanización.

Reactivo	Abreviatura	Estructura
Hexametildisilazano	HMDS	$(\text{CH}_3)_3\text{Si-NH}-(\text{CH}_3)_3$
Trimetilclorosilano	TMCS	$(\text{CH}_3)_3\text{Si-Cl}$
N-metil-N-trimetilsililacetamida	MSA	$(\text{CH}_3)_3\text{CO-N}(\text{CH}_3)\text{-Si}(\text{CH}_3)_3$
N-trimetilsilil dietilamina	TMSDEA	$(\text{CH}_3)_3\text{Si-NH}-(\text{C}_2\text{H}_5)_2$
N-trimetilsilil dimetilamina	TMSDMA	$(\text{CH}_3)_3\text{Si-NH}-(\text{CH}_3)_2$
N-metil-N-trimetilsilil trifluoroacetamida	MSTFA	$(\text{CF}_3)\text{CO- N}(\text{CH}_3)\text{-Si}(\text{CH}_3)_3$
N,O-Bis(trimetilsilil) acetamida	BSA	$(\text{CH}_3)\text{-C-OSi}(\text{CH}_3)_3\text{=N-Si}(\text{CH}_3)_3$
N,O-Bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida	BSTFA	$(\text{CF}_3)\text{-C-OSi}(\text{CH}_3)_3\text{=N-Si}(\text{CH}_3)_3$
N-trimetilsilil imidazol	TMSI	$(\text{CH}_3)_3\text{-Si-Imidazol}$

En esta memoria se seleccionó como agente derivatizante el BSTFA atendiendo a las buenas propiedades atribuidas en la bibliografía consultada.

La reacción general que tiene lugar entre compuestos con grupos -OH, como es el caso de los AP y APEO y el agente derivatizante es la siguiente:



El orden de reactividad de los compuestos orgánicos con estos reactivos es el siguiente:

Hidroxil alcohol > OH fenólico > carboxilo > amina > amida

siendo los alcoholes primarios los más susceptibles de reacción, seguidos de los secundarios y finalmente los terciarios.

Una característica de los derivados es su sensibilidad a la presencia de humedad, que provoca la hidrólisis de los mismos, motivo por el cual se debe evitar la presencia de ésta en los procedimientos de derivatización. Para asegurar del buen estado del agente derivatizante durante todos los ensayos realizados, después de cada uso y antes de cerrar el envase que lo contenía, se le aplicaba una corriente de nitrógeno durante 30 segundos, desplazando de esta forma el aire contenido en el envase.

2.3 - Caracterización de los compuestos mediante GC-MS

A continuación se establecen las características tanto cromatográficas como espectrométricas de los compuestos objeto de estudio. Para ello, en un vial de 7 mL de capacidad se introdujo 1 mL de una disolución metanólica que contenía $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de 4-*t*-OP, 4-*n*-OP y 4-*n*-NP; $2.6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Igepal CA-210 y $5.4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Igepal CA-520. Se eliminó el disolvente bajo corriente de N_2 y se añadió 50 μL del reactivo silanizante BSTFA y 50 μL de acetato de etilo que contenía $36 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de acenafteno (sustancia empleada como patrón interno) y se cerró el vial, agitando posteriormente durante 1 minuto. Posteriormente se calentó durante 20 minutos a 70 °C y a continuación se dejó que alcanzara temperatura ambiente. Se volvió a agitar el vial durante un minuto y finalmente la disolución se trasvasó a un vial cromatográfico con inserto de vidrio para ser analizada mediante GC-MS.

Para el análisis mediante CG-MS, se ensayaron diferentes temperaturas iniciales de columna (120, 150, y 180 °C), distintas rampas (5, 10 y 15 °C / min) y diferentes temperaturas finales de columna (290, 300 y 320 °C) para elegir aquellas condiciones instrumentales que permitieran el mejor compromiso entre resolución y tiempo de análisis empleado. Las condiciones seleccionadas por adaptarse mejor a este criterio se recogen en la *Tabla 4.31*.

Tabla 4.31 - Variables instrumentales empleadas para la determinación de AP y APEO.

GC		MS	
Variable	Valor	Variable	Valor
Temperatura del inyector	240 °C	Temperatura de la interfase	290 °C
Temperatura inicial de la columna	120 °C (5 min)	Rango m/z del espectro de masas	50-1000
Gradiente de temperaturas	15 °C/min, 320 °C (16 min)	Modo	SIM/SCAN
Volumen de inyección	2 µL	Dwell	100 ms

Fue necesario escoger una rampa pronunciada y con la temperatura final más elevada posible ya que los compuestos con mayor número de unidades etoxiladas quedaban fuertemente retenidos en la columna, de forma que cuanto menor era la temperatura final de la rampa, menor era el número de picos obtenidos. El máximo número de unidades etoxiladas que pudo determinarse fue de 7.

A continuación se muestra el cromatograma obtenido (*Figura 4.13*) empleando las condiciones de la *Tabla 4.31*.

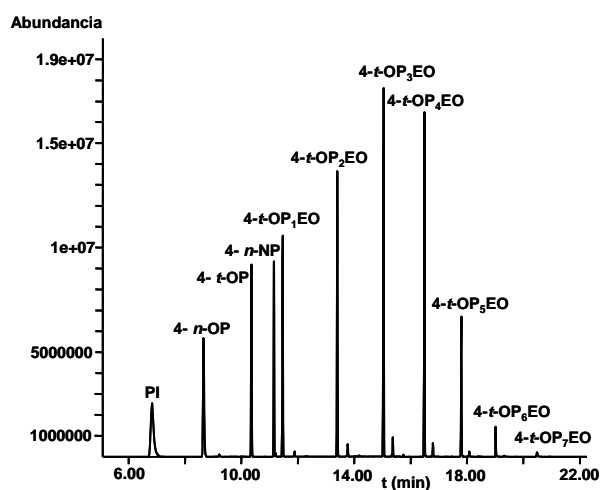


Figura 4.13. Cromatograma en modo Scan.

Con objeto de seleccionar los fragmentos característicos y de mayor abundancia de cada uno de los compuestos, se estudiaron los espectros de masas correspondientes a los diferentes picos cromatográficos obtenidos.

En el caso del patrón interno los fragmentos seleccionados para el establecimiento del modo SIM fueron los de relación m/z 154 y 153, correspondientes al pico molecular y a la pérdida de un protón $[M-1]$ respectivamente.

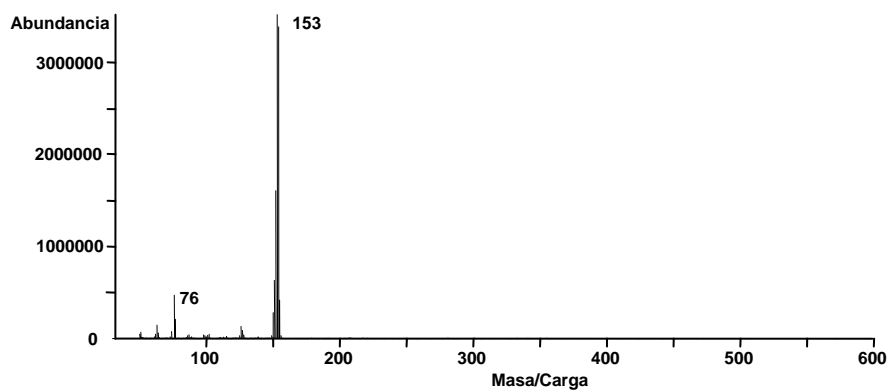


Figura 4.14 - Espectro de masas del acenafeno.

En las *Figuras 4.15 a 4.24* se presentan los espectros de masas de los compuestos objeto de estudio (4-*t*-OP, 4-*n*-OP, 4-*t*-OP, 4-*t*-OP₁EO, 4-*t*-OP₂EO, 4-*t*-OP₃EO, 4-*t*-OP₄EO, 4-*t*-OP₅EO, 4-*t*-OP₆EO y 4-*t*-OP₇EO).

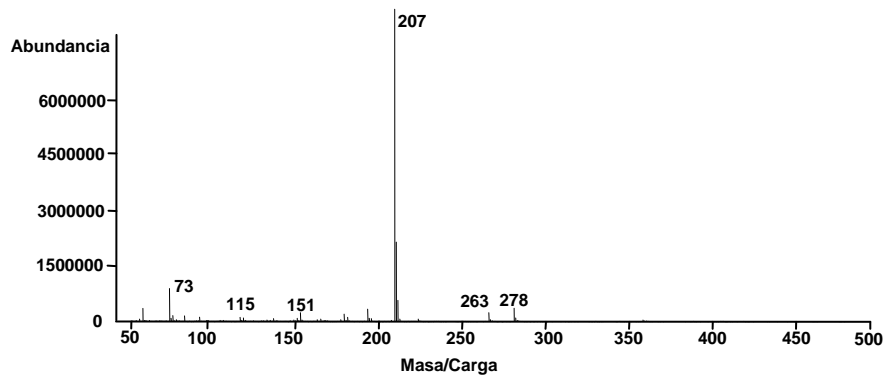


Figura 4.15 - Espectro de masas del 4-t-OP.

Los fragmentos característicos del 4-*t*-OP son los de relación masa/carga 278 y 263, correspondientes al pico molecular y a la pérdida de un grupo metilo [M-15] respectivamente.

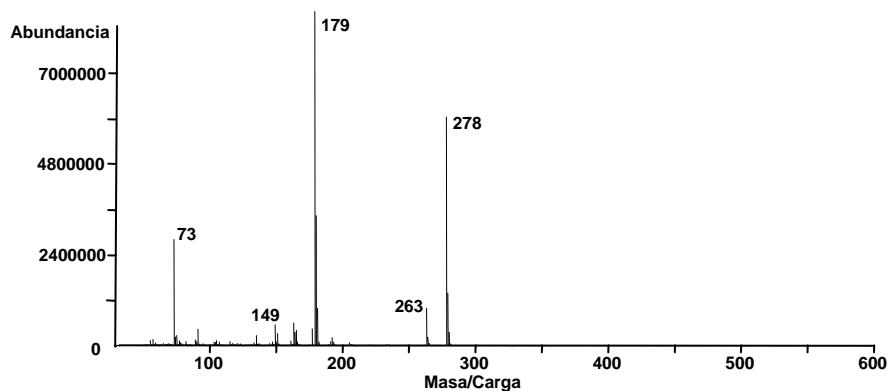


Figura 4.16 - Espectro de masas del 4-n-OP.

Como es obvio, el 4-*n*-OP presenta los mismos fragmentos característicos que su isómero el 4-*t*-OP, siendo eso sí las abundancias de estos fragmentos diferentes.

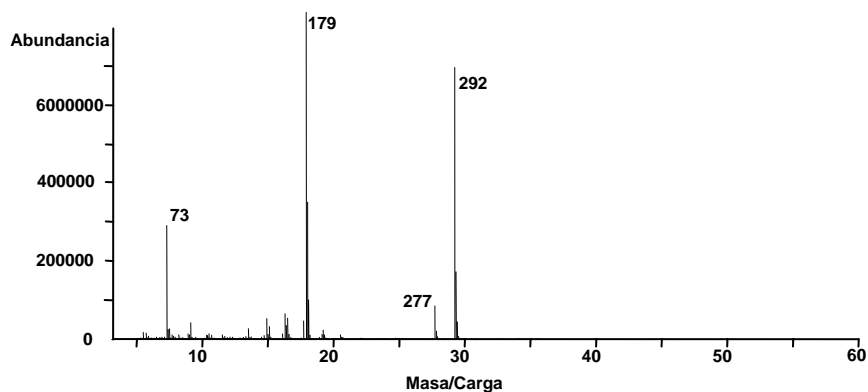


Figura 4.17 - Espectro de masas del 4-n-NP.

Los fragmentos característicos del 4-*n*-NP son los de relación masa/carga 292 y 277 correspondientes al pico molecular y la pérdida de un grupo metilo [M-15].

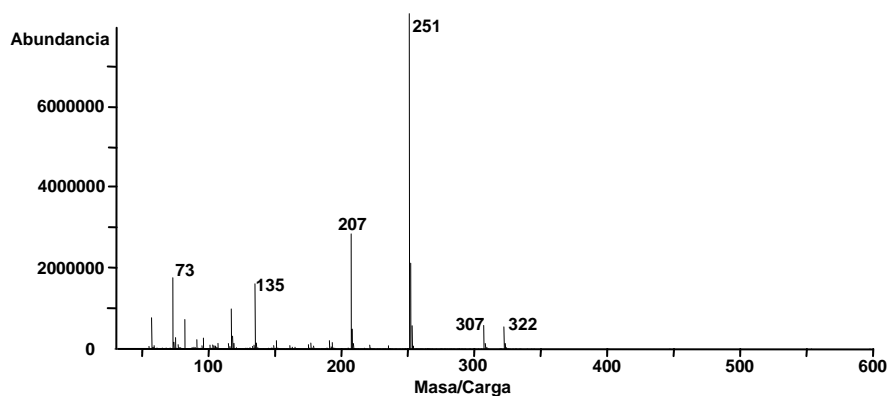


Figura 4.18 - Espectro de masas del 4-t-OP₁EO.

En el espectro de masas del 4-*t*-OP₁EO aparece el pico de relación masa carga 322, que corresponde al pico molecular, y el pico de relación masa carga 307, correspondiente a la pérdida de un grupo metilo [M-15].

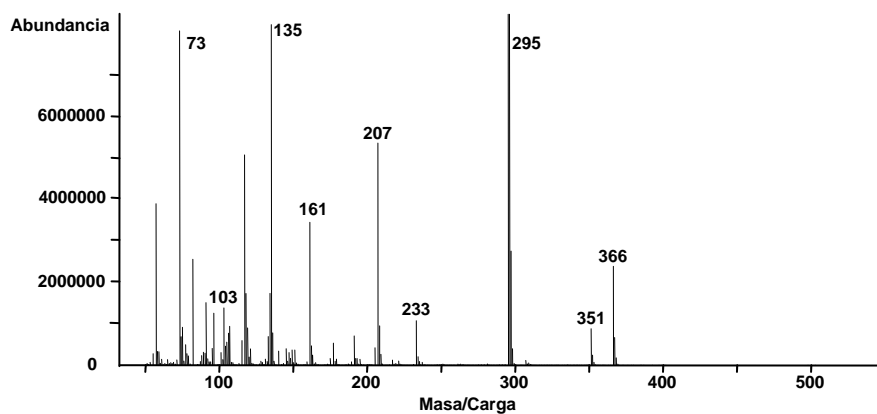


Figura 4.19 - Espectro de masas del 4-t-OP₂EO.

Los fragmentos característicos del 4-t-OP₂EO son el pico molecular ($m/z=366$) y el correspondiente a la pérdida de un grupo metilo ($m/z=351$).

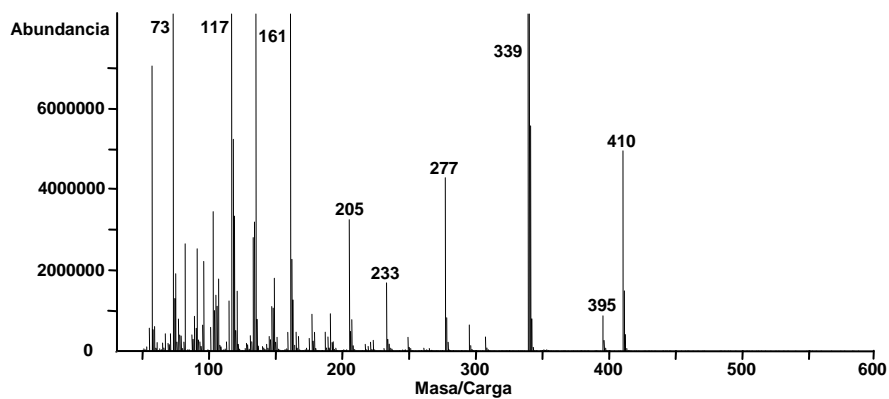


Figura 4.20 - Espectro de masas del 4-t-OP₃EO.

En el espectro de masas del 4-t-OP₃EO aparece el pico de relación masa/carga 410, que corresponde al pico molecular, y el pico de relación masa/carga 395, correspondiente a la pérdida de un grupo metilo [M-15].

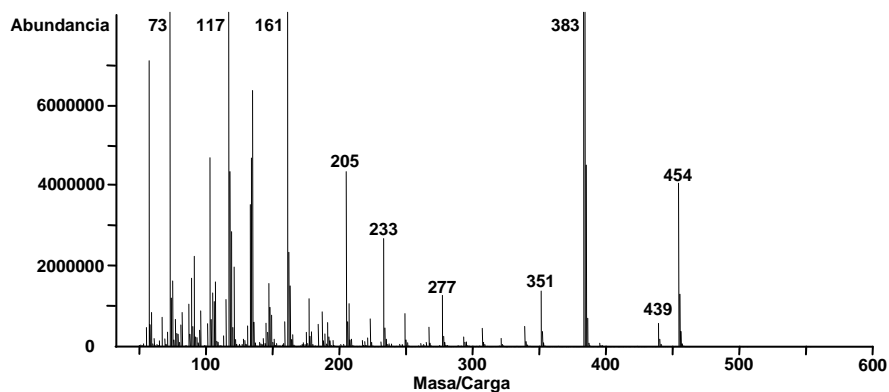


Figura 4.21 - Espectro de masas del 4-t-OP₄EO.

Los fragmentos característicos del 4-t-OP₄EO son el pico molecular ($m/z=454$) y el correspondiente a la pérdida de un grupo metilo ($m/z=439$).

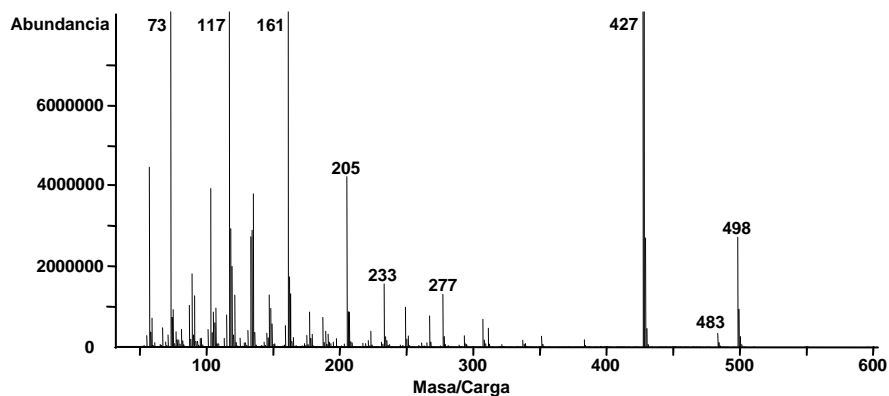


Figura 4.22 - Espectro de masas del 4-t-OP₅EO

En el espectro de masas del 4-t-OP₅EO aparece un pico de mayor intensidad de relación masa/carga 498, que corresponde al pico molecular,

y otro de menor intensidad, de relación masa/carga 483, correspondiente a la pérdida de un grupo metilo [M-15].

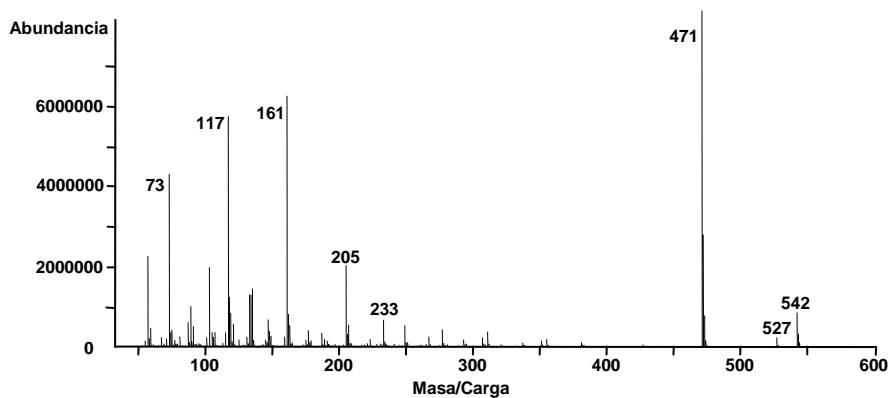


Figura 4.23 - Espectro de masas del 4-t-OP₆EO.

Los fragmentos característicos del 4-t-OP₆EO son los de relación masa/carga 542 y 527 correspondiente al pico molecular y a la pérdida de un grupo metilo, respectivamente.

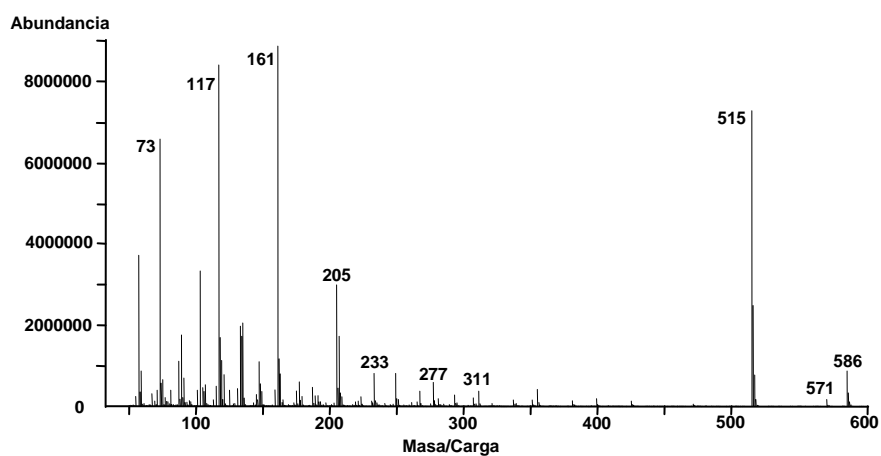


Figura 4.24 - Espectro de masas del 4-t-OP₇EO.

En el espectro del 4-*t*-OP₇EO aparece el fragmento de relación masa/carga 586 correspondiente al pico molecular y uno de menor intensidad, de relación masa/carga 571, correspondiente a la pérdida de un grupo metilo [M-15].

En todos los espectros aparece el pico de relación carga/masa 73 que corresponde al grupo trimetilsilil- [-Si(CH₃)₃].

En resumen se concluye que los fragmentos característicos seleccionados de cada compuesto corresponden al fragmento de su pico molecular y al correspondiente a la pérdida de un grupo metilo [M-15].

En la **Tabla 4.32** se recopilan los fragmentos seleccionados para el establecimiento del modo SIM y el tiempo inicial del análisis de cada ión.

Tabla 4.32 - Parámetros seleccionados para el modo SIM.

Compuesto	t _i (min)	Fragmento (m/z)
Patrón interno	5.00	153, 154
4-<i>t</i>-OP	11.60	263, 278
4-<i>n</i>-OP	13.20	263, 278
4-<i>n</i>-NP	14.25	277, 292
4-<i>t</i>-OP₁EO	14.80	251, 307, 322
4-<i>t</i>-OP₂EO	16.00	295, 351, 366
4-<i>t</i>-OP₃EO	18.00	339, 395, 410
4-<i>t</i>-OP₄EO	19.20	383, 439, 454
4-<i>t</i>-OP₅EO	21.00	427, 483, 498
4-<i>t</i>-OP₆EO	23.20	471, 527, 542
4-<i>t</i>-OP₇EO	27.00	515, 571, 586

2.4 - Optimización del proceso de derivatización

A continuación se describe la influencia de las principales variables que pueden afectar a la reacción de derivatización: tiempo de reacción, temperatura de reacción y porcentaje de agente derivatizante. Todas las pruebas se llevaron a cabo introduciendo en un vial de 7 mL, 1 mL de una disolución que contenía $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de 4-*t*-OP; $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de 4-*n*-OP; $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de 4-*n*-NP; $2.6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Igepal CA-210 y $5.4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Igepal CA-520, eliminando el disolvente bajo corriente de N_2 y reconstituyendo con un volumen final de 100 μL (50 μL de BSTFA y 50 μL de acetato de etilo, conteniendo $36 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de acenafteno, excepto en el estudio de la influencia del porcentaje de BSTFA donde los volúmenes y la concentración varían).

2.4.1 - Influencia del tiempo de reacción

Para este estudio se ensayaron los siguientes tiempos de reacción: 5, 10, 20, 30 y 45 minutos, todos ellos a una temperatura de 70 °C. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 4.25**.

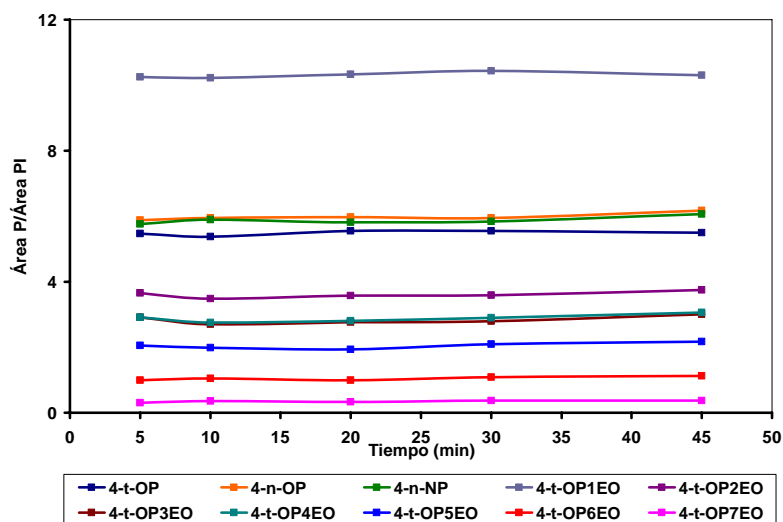


Figura 4.25. Influencia del tiempo en la reacción de silanización.

La señal analítica (Área pico/Área PI) no se ve afectada con el aumento del tiempo de reacción indicando que la silanización de los compuestos objeto de estudio alcanza el equilibrio rápidamente. El tiempo de reacción seleccionado fue por tanto de 5 minutos.

2.4.2 - Influencia de la temperatura de reacción

Para comprobar la influencia de la temperatura en la reacción de silanización de los analitos, se estudió la reacción a 6 temperaturas diferentes: Temperatura ambiente, 40, 60, 70, 80 y 100 °C, manteniendo fijo el tiempo seleccionado como óptimo en el apartado anterior (5 minutos). Los resultados se muestran en la *Figura 4.26*.

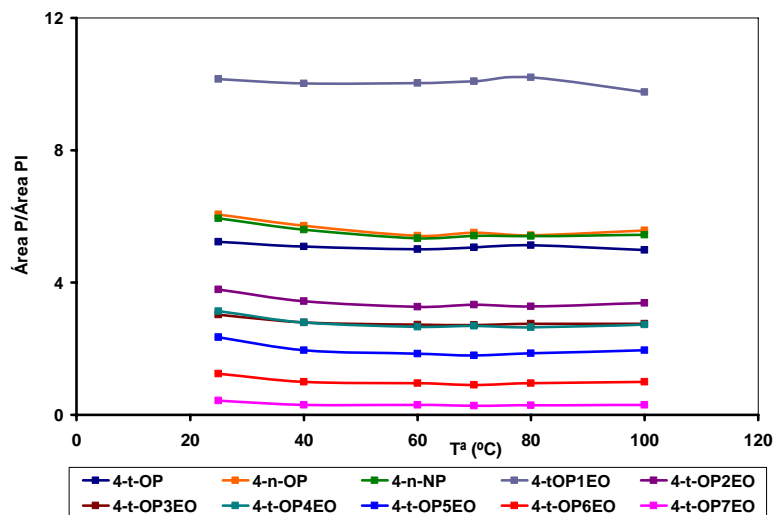


Figura 4.26. Influencia de la temperatura en la reacción de silanización.

Se observa que la temperatura no es un factor determinante en la reacción de silanización de AP y APEO. Si bien, a temperaturas muy altas aparece cierto descenso en la señal de 4-*t*-OP₁EO y 4-*t*-OP que podría deberse a la degradación térmica de estos analitos.

La temperatura seleccionada para llevar a cabo la reacción de silanización fue la temperatura ambiente.

2.4.3 - Influencia del porcentaje de BSTFA

El estudio de la influencia del porcentaje de BSTFA en la reacción de derivatización se llevó a cabo variando los porcentajes de este agente derivatizante en el rango de 20 a 80 %, manteniendo constantes los

valores de tiempo y temperatura optimizados anteriormente (5 minutos y T^a ambiente). El volumen final del vial a inyectar fue siempre 100 μL y se prepararon distintas concentraciones de acenafteno en acetato de etilo de forma que la concentración final del mismo siempre fuera 18 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. En la **Figura 4.27** se muestran los resultados obtenidos:

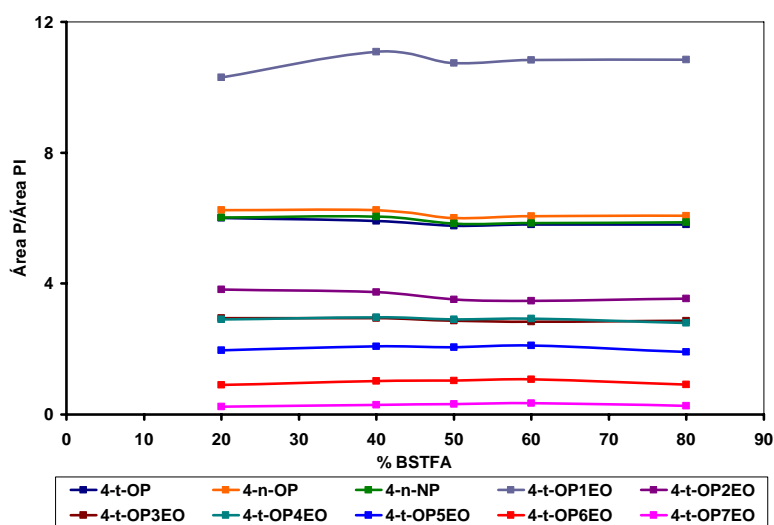


Figura 4.27 - Influencia de la temperatura en la reacción de silanización.

Como puede observarse no hay una tendencia clara, aunque la señal analítica es máxima en el caso de 4-*n*-OP, 4-*n*-NP y 4-*t*-OP cuando el porcentaje de BSTFA usado es del 40 %. El resto de analitos no experimenta ningún cambio relevante al variar el porcentaje de BSTFA empleado en la reacción. Por tanto se escogió el 40 % de BSTFA como porcentaje óptimo para llevar a cabo la silanización de los analitos.

2.5 - Procedimiento operatorio para el tratamiento de las muestras

El procedimiento operatorio adoptado finalmente para el tratamiento de muestras de suelo es el que se indica a continuación:

Como resultado del proceso de extracción de 5 gramos de suelo con disolventes presurizados se obtiene un extracto metanólico de aproximadamente 45 mL que se evapora en rotavapor hasta un volumen igual o menor a 35 mL. Este volumen se transvasa a una probeta y se completa el volumen necesario hasta 35 mL con metanol. Posteriormente se introduce en un matraz de 100 mL de capacidad, enrasando al volumen final con agua destilada. Esta muestra de 100 mL de volumen constituye la carga hidrometanólica del procedimiento de SPE.

Tras llevar a cabo el procedimiento de SPE se obtiene un volumen de eluato de 5 mL, que seca bajo corriente de nitrógeno a temperatura ambiente. Una vez evaporado completamente, se redisuelve con 60 μL de acetato de etilo conteniendo 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de acenafteno más 40 μL del agente derivatizante BSTFA, agitando durante un minuto. Se deja reposar el vial 5 minutos a temperatura ambiente para que se complete la reacción de silanización, se agita durante 1 minuto y finalmente se trasvasa el extracto a un vial cromatográfico con inserto de vidrio para su análisis mediante GC-MS.

El procedimiento de SPE permite concentrar los analitos 1000 veces (100 mL de volumen inicial a 100 μL de volumen final) mientras que el tratamiento de muestra completo logra concentrar los analitos 50 veces ya que se parte de 5 gramos de suelo y el volumen final del extracto es 100 μL .

2.6 - Parámetros analíticos del método desarrollado

A continuación se comentan los parámetros analíticos optimizados para el método propuesto tras la obtención de los datos experimentales.

2.6.1 - Establecimiento y verificación del modelo

El modelo de calibración seleccionado fue el lineal de regresión univariante por mínimos cuadrados. Como patrón interno se usó el acenafteno, construyendo las correspondientes curvas de calibración usando el cociente de áreas analito/patrón interno, frente a concentración de analito.

Como se comentó en el **apartado 1.6** del presente Capítulo, debido a que las mezclas Igepal CA-210 e Igepal CA-520 contienen constituyentes comunes en su composición, el proceso de calibración se llevó a cabo en dos pasos, el primero empleando los patrones 4-*t*-OP, 4-*n*-OP, 4-*n*-NP y la mezcla Igepal CA-210 y el segundo empleando solo la mezcla Igepal CA-520.

Para establecer la curva de calibración en muestras de suelo fortificadas se realizó por separado el calibrado del Igepal CA-210 e Igepal CA-520. Las funciones de calibración se establecieron siguiendo el procedimiento que se describe a continuación: se prepararon una serie de tubos, pesando 5.0 gramos de suelo y fortificándolo el día anterior al análisis (aproximadamente 24 horas antes). Se dejó evaporar el volumen sobrenadante y se introdujo en una estufa a 50 °C durante 4 horas. Para cada AP y la mezcla Igepal CA-210 se prepararon 6 niveles de

concentración (entre 10.0 y 200.0 ng·g⁻¹ para los AP y entre 9.92 y 198.4 para el Igepal CA-210) y para la mezcla Igepal CA-520 se prepararon 8 niveles (entre 270.0 y 12780.0 ng·g⁻¹). Cada una de las concentraciones se preparó por triplicado y cada nivel de concentración se analizó por duplicado.

Se siguieron los procedimientos de extracción con disolventes presurizados, extracción en fase sólida y separación cromatográfica anteriormente descritos y se construyó una curva de calibración utilizando el cociente de áreas analito/patrón interno, frente a concentración de analito.

Los parámetros estadísticos del modelo para el método de determinación de AP y APEO en suelos mediante GC-MS, son los que se muestran en la ***Tabla 4.33***.

Tabla 4.33 - Parámetros estadísticos para la determinación de AP y APEO en suelos mediante GC-MS.

Analito	b*	S _b	a	S _a	R ² **	S _{x/y}	P _{lof} **
4-t-OP	4.4·10 ⁻³	5.0·10 ⁻⁵	8.6·10 ⁻³	5.1·10 ⁻³	99.87	0.0222	13.4
4-n-OP	6.9·10 ⁻³	3.0·10 ⁻⁵	5.1·10 ⁻³	3.2·10 ⁻³	99.98	0.0139	35.9
4-n-NP	7.7·10 ⁻³	4.0·10 ⁻⁵	2.3·10 ⁻³	3.3·10 ⁻³	99.98	0.0146	11.1
4-t-OP ₁ EO	5.1·10 ⁻³	3.0·10 ⁻⁵	-3.7·10 ⁻³	2.5·10 ⁻³	99.97	0.0089	17.4
4-t-OP ₂ EO	4.5·10 ⁻³	4.0·10 ⁻⁵	2.1·10 ⁻³	8.0·10 ⁻⁴	99.95	0.0027	13.9
4-t-OP ₃ EO	1.85·10 ⁻³	2.0·10 ⁻⁵	-8.7·10 ⁻³	6.5·10 ⁻³	99.95	0.0234	98.9
4-t-OP ₄ EO	6.2·10 ⁻⁴	2.0·10 ⁻⁵	-10.4·10 ⁻³	8.6·10 ⁻³	99.86	0.0311	96.7
4-t-OP ₅ EO	5.4·10 ⁻⁴	0.4·10 ⁻⁵	-3.2·10 ⁻³	2.9·10 ⁻³	99.96	0.0122	66.4
4-t-OP ₆ EO	2.1·10 ⁻⁴	1.0·10 ⁻⁵	-9.2·10 ⁻³	2.9·10 ⁻³	99.47	0.0124	42.0
4-t-OP ₇ EO	4.6·10 ⁻⁵	6.0·10 ⁻⁶	-7.1·10 ⁻³	5.6·10 ⁻⁴	99.87	0.0016	6.2

* Expresado en ng·g⁻¹; ** Expresado en %.

Para la verificación del modelo, se tuvieron en cuenta dos parámetros:

- 1) *Evaluación del fallo de ajuste (P_{Lof}):* para determinar la tendencia lineal de los datos. En la **Tabla 4.33** se observa en que en todos los casos el valor *P* obtenido es mayor del 5 %, por tanto se concluye que no existe curvatura, es decir, los datos se ajustan al modelo lineal seleccionado.
- 2) *Evaluación de la condición de homocedasticidad,* es decir, homogeneidad de varianzas. Para esta finalidad se empleó el análisis gráfico de los residuos, observándose que se cumplían las premisas fijadas en todos los casos. Por tanto, se puede afirmar que los datos son homocedásticos.

2.6.2 - Parámetros de calidad del método analítico

2.6.2.1 - Límite de detección y cuantificación

Para el cálculo de estos parámetros se utilizó la metodología basada en la recta de calibrado, descrita en la opción **b** del apartado 5.3.4 del **Capítulo Experimental: Materiales y Métodos**.

Los resultados se presentan en la **Tabla 4.34**:

Tabla 4.34 - Límites de detección y cuantificación para la determinación de AP y APEO mediante GC-MS.

Analito	LD (ng·g ⁻¹)	LQ (ng·g ⁻¹)
4- <i>t</i> -OP	4	10
4- <i>n</i> -OP	3	9
4- <i>n</i> -NP	3	9
4- <i>t</i> -OP ₁ EO	3	9
4- <i>t</i> -OP ₂ EO	1	3
4- <i>t</i> -OP ₃ EO	19	62
4- <i>t</i> -OP ₄ EO	38	126
4- <i>t</i> -OP ₅ EO	32	106
4- <i>t</i> -OP ₆ EO	34	115
4- <i>t</i> -OP ₇ EO	36	118

2.6.2.2 - Rango dinámico lineal y Linealidad

En la **Tabla 4.35** se muestran los valores obtenidos para el Rango Dinámico Lineal (*RDL*), la Linealidad (*LIN*), la Desviación Estándar Relativa (*DER*) y la Sensibilidad Analítica ($S_{analítica}$).

Tabla 4.35 - RDL, LIN on line, DER y $S_{analítica}$ para la determinación de AP y APEO.

Analito	RDL (ng·g ⁻¹)	LIN (%)	DER (%)	S_{anal} (ng·g ⁻¹)
4-t-OP	10-200	98.78	1.22	5.01
4-n-OP	9-200	99.51	0.49	2.00
4-n-NP	8-200	99.54	0.46	1.90
4-t-OP₁EO	8-150	99.39	0.61	1.73
4-t-OP₂EO	3-40	99.20	0.80	0.60
4-t-OP₃EO	62-815	99.17	0.83	12.65
4-t-OP₄EO	126-975	98.59	1.41	50.16
4-t-OP₅EO	106-1625	99.32	0.68	22.59
4-t-OP₆EO	115-1153	97.51	2.49	59.04
4-t-OP₇EO	118-1480	98.68	1.32	34.78

En todos los casos la linealidad “on line” es superior al 95 %. Se puede, por tanto, afirmar que los datos experimentales se ajustan al modelo lineal propuesto.

2.6.2.3 - Precisión

Con el fin de evaluar la precisión del método analítico se estimó la repetibilidad intra- e inter- día. Para ello se llevaron a cabo dos experiencias: la primera para hallar la repetibilidad intra- e inter- día del 4-*t*-OP, 4-*n*-OP, 4-*n*-NP, 4-*t*-OP₁EO y 4-*t*-OP₂EO empleando para ello los correspondientes AP y la mezcla Igepal CA-210 y la segunda para hallar la repetibilidad intra- e inter- día de los APEO que contienen de 3 a 7 unidades etoxiladas, empleando para ello la mezcla Igepal CA-520. En la primera experiencia se fortificaron muestras de blanco de suelo a tres niveles de concentración de 4-*t*-OP, 4-*n*-OP, 4-*n*-NP e Igepal CA-210 (25.0, 75.0 y 150.0 ng·g⁻¹ para los AP y 24.8, 74.4 y 148.8 ng·g⁻¹ para el Igepal CA-210) y se analizó por triplicado. Este procedimiento se repitió cada uno de los 3 días que duró el estudio. De la misma forma se realizó la segunda experiencia, fortificando las muestras de blanco de suelo con Igepal CA-520 a tres niveles de concentración (540.0, 1620.0, 4320.0 ng·g⁻¹).

Las muestras se trataron mediante el procedimiento de extracción con disolventes presurizados y de extracción en fase sólida ya descritos con anterioridad y se inyectaron en el cromatógrafo de gases fijando las condiciones instrumentales habituales.

La recuperación se evaluó comparando las relaciones de áreas de muestras fortificadas con las relaciones de áreas proporcionadas por muestras de suelo no fortificadas que fueron sometidas a todo el proceso (extracción, purificación, concentración) añadiendo el correspondiente patrón disuelto en el acetato de etilo (que contiene también el patrón interno) usado como

medio de reacción en la derivatización. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 4.36**:

Tabla 4.36 - Recuperaciones (%) intra e inter día y precisión (DER, %).*

Analito	Recuperación (%) y precisión (DER, %)			
	Nivel	1	2	3
4- <i>t</i> -OP	25.0	61 (2)	62 (2)	60 (2)
	75.0	63 (2)	62 (3)	62 (2)
	150.0	62 (3)	60 (2)	63 (2)
4- <i>n</i> -OP	25.0	64 (2)	63 (1)	65 (2)
	75.0	66 (2)	64 (3)	65 (3)
	150.0	63 (3)	65 (2)	63 (2)
4- <i>n</i> -NP	25.0	69 (2)	70 (3)	68 (2)
	75.0	70 (3)	68 (2)	70 (1)
	150.0	71 (2)	70 (3)	69 (2)
4- <i>t</i> -OP ₁ EO	19.0	93 (2)	90 (2)	92 (2)
	57.1	91 (2)	92 (2)	90 (3)
	114.3	93 (3)	91 (3)	94 (2)
4- <i>t</i> -OP ₂ EO	5.8	96 (2)	98 (2)	95 (3)
	17.3	97 (3)	95 (3)	96 (2)
	34.5	95 (2)	97 (3)	97 (2)
4- <i>t</i> -OP ₃ EO	101.8	96 (3)	99 (2)	97 (3)
	305.4	99 (3)	96 (2)	98 (4)
	814.4	96 (3)	97 (4)	99 (3)
4- <i>t</i> -OP ₄ EO	123.4	98 (3)	99 (2)	97 (3)
	370.2	100 (3)	98 (2)	97 (3)
	987.2	99 (3)	99 (3)	97 (2)
4- <i>t</i> -OP ₅ EO	101.5	99 (3)	98 (3)	101 (3)
	304.5	98 (3)	99 (3)	100 (3)
	812.0	97 (4)	98 (3)	100 (3)
4- <i>t</i> -OP ₆ EO	216.2	97 (3)	96 (2)	98 (3)
	576.6	96 (2)	97 (4)	99 (3)
4- <i>t</i> -OP ₇ EO	138.8	100 (3)	99 (2)	98 (3)
	370.1	97 (4)	99 (3)	98 (3)

* Media de tres determinaciones. DER (%): desviación estándar relativa.

En el caso del 4-*t*-OP₆EO y 4-*t*-OP₇EO sólo se disponen de las recuperaciones a dos niveles de concentración porque la menor no se encontraba dentro del rango dinámico lineal establecido anteriormente para estos.

En todos los casos, la desviación estándar relativa es menor del 10 % y se puede concluir que el método propuesto suministra resultados muy próximos entre sí y, por lo tanto, cumple con los requisitos de precisión.

2.6.2.4 - Sensibilidad o Resolución analítica

De acuerdo con los datos experimentales obtenidos, las resoluciones analíticas calculadas para cada componente se expresan la **Tabla 4.35**.

2.7 - Validación del método desarrollado

La validación de la metodología propuesta para la determinación de AP y APEO mediante GC-MS se llevó a cabo usando muestras de suelo, procedente de la zona no saturada de una parcela agrícola de la Vega de Granada, libre de los analitos objeto de estudio.

Las muestras empladas para llevar a cabo la validación se prepararon usando 5 gramos de suelo fortificado en los mismos niveles de concentración que los que se emplearon para el calibrado. El suelo se sometió a los procesos de extracción/purificación/concentración. El estudio se llevó realizando tres réplicas experimentales y dos réplicas

instrumentales de cada nivel de concentración ensayado. Con los datos obtenidos, se realizó un test de recuperación de **t-Student**.

Los resultados obtenidos se presentan a en la **Tabla 4.37**. En el caso del Igepal CA-520 para cada componente aparecen aquellas concentraciones que se encuentran dentro del rango dinámico lineal.

Tabla 4.37 - Veracidad del método para la determinación de AP y APEO.

Analito	Veracidad				
	Conc. añadida (ng·g ⁻¹)	Conc. encontrada (ng·g ⁻¹)	Rec. (%)	t _{calc.}	P (%)
4-t-OP	20.0	20.2 ± 0.3	101	1.63	16
	40.0	39.7 ± 0.5	99	1.47	20
	60.0	59.0 ± 1.7	98	1.44	21
	80.0	81.6 ± 2.4	102	1.63	16
	160.0	157.2 ± 3.6	98	1.90	12
4-n-OP	20.0	19.5 ± 0.6	97	2.04	10
	40.0	40.9 ± 1.1	102	2.00	10
	60.0	60.2 ± 2.3	100	0.21	84
	80.0	77.9 ± 2.7	97	1.90	11
	160.0	163.0 ± 3.1	102	2.37	6
4-n-NP	20.0	20.7 ± 0.9	103	1.90	12
	40.0	39.2 ± 1.5	98	1.31	25
	60.0	61.3 ± 1.9	102	1.68	16
	80.0	80.4 ± 2.4	100	0.41	70
	160.0	157.9 ± 2.9	98	1.77	14
4-t-OP₁EO	19.0	19.1 ± 0.2	100	1.22	28
	38.1	37.4 ± 0.8	98	2.14	9
	57.1	56.2 ± 1.1	98	2.00	10
	76.2	74.7 ± 1.9	98	1.94	11
	133.3	135.9 ± 2.8	102	2.27	7

Tabla 4.37 - Veracidad del método para la determinación de AP y APEO.(cont.)

Analito	Veracidad				
	Conc. añadida (ng·g ⁻¹)	Conc. encontrada (ng·g ⁻¹)	Rec. (%)	t _{calc.}	P (%)
4- <i>t</i> -OP ₂ EO	5.8	5.7 ± 0.4	98	0.61	57
	11.5	12.0 ± 0.7	104	1.75	14
	17.2	16.8 ± 0.8	98	1.22	28
	23.0	23.5 ± 0.9	102	1.36	23
	40.2	40.1 ± 1.0	100	0.24	82
4- <i>t</i> -OP ₃ EO	101.8	101.1 ± 1.2	99	1.43	21
	203.6	205.2 ± 2.3	101	1.70	15
	305.4	307.3 ± 3.1	101	1.50	19
	509.0	506.0 ± 4.6	99	1.59	17
4- <i>t</i> -OP ₄ EO	123.4	125.4 ± 2.1	102	2.33	7
	246.8	245.7 ± 2.5	99	1.08	33
	370.2	366.9 ± 3.7	99	0.20	85
	617.0	620.3 ± 5.8	101	1.39	22
4- <i>t</i> -OP ₅ EO	101.5	102.7 ± 2.2	101	1.34	24
	203.0	205.9 ± 3.5	101	2.03	10
	304.5	300.2 ± 5.1	98	2.06	9
	507.5	508.0 ± 5.8	100	0.21	84
	1015.0	1002.7 ± 15.3	99	1.97	10
4- <i>t</i> -OP ₆ EO	144.2	140.3 ± 4.9	97	1.95	11
	216.2	222.7 ± 7.2	103	2.21	8
	360.4	365.0 ± 7.9	101	1.42	21
	720.8	730.1 ± 12.1	101	1.88	12
4- <i>t</i> -OP ₇ EO	138.8	142.1 ± 4.2	102	1.92	11
	231.3	233.5 ± 4.6	101	1.17	29
	462.6	457.2 ± 6.2	99	2.13	9
	925.2	920.4 ± 9.4	99	1.25	27

Para los 4-*t*-OPEO de 3, 4, 6 y 7 sólo se disponen datos a 4 niveles de concentración porque la concentración menor no estaba dentro del rango dinámico lineal establecido anteriormente para estos compuestos.

A los datos experimentales obtenidos se les aplicó el test de comparación de una media experimental con un valor conocido. Los valores de t_{calc} fueron en todos los casos inferiores a los valores de t_{tab} , resultando en la aceptación de la hipótesis nula (no hay diferencia significativas entre las concentraciones encontradas y las añadidas), demostrándose con esto que el método desarrollado produce resultados veraces.

3.- APLICACIÓN DE LA METODOLOGÍA DESARROLLADA

En este apartado se expone la aplicación de las metodologías analíticas desarrolladas para la determinación de AP y APEO en muestras de suelo.

Por una parte, se llevó a cabo la determinación de estos analitos en 15 muestras de suelo recogidas en distintos puntos de la Vega de Granada, y por otra, un estudio de campo consistente en la determinación de 4-*t*-OPEO en suelo agrícola previamente regado con agua que contenía Igepal CA-210 e Igepal CA-520. A continuación se expone con más detalle cada uno de estos estudios.

3.1 - Determinación de AP y APEO en suelo de la Vega de Granada

El objetivo de este estudio era verificar la presencia o ausencia de alquilfenoles y alquilfenoles etoxilados en suelo de la Vega de Granada. Para ello se realizaría un muestreo consistente en la recolección de 15 muestras de suelo en distintas localidades de la Vega de Granada y se analizarían utilizando las metodologías desarrollada en los **Apartado 1 y 2** del presente Capítulo, que empleaban como técnicas analíticas la cromatografía líquida con detección fluorescente y cromatografía de gases con detección de masas.

Las localidades donde se colectaron las muestras fueron: Alhendín (1 punto); Belicena (2 puntos); Churriana de la Vega (3 puntos); Cúllar Vega (2 puntos); Granada (1 punto); Las Gabias (3 puntos); La Malahá (1 punto); Polanco (1 punto) y Vegas de Genil (1 punto). Una de las

muestras procedentes de Belicena era de la Finca Santa María, lugar donde se llevan a cabo los estudios de campo.

Todas las muestras se colectaron de la capa superficial (a 2 cm de profundidad aproximadamente). Para la determinación de AP y APEO en estos suelos, se procesaron muestras por duplicado, una para llevar a cabo el análisis mediante LC-FD y otra para llevar a cabo el análisis mediante GC-MS.

En la **Figura 4.28** se muestran las zonas de la Vega de Granada donde se realizó la toma de las muestras.

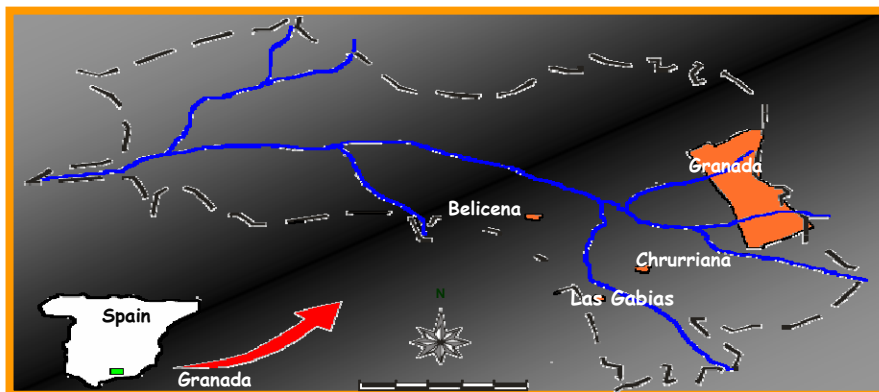


Figura 4.28 - Mapa de la zona donde se realizó la colecta de muestras.

El resultado del análisis fue que no se detectaron APEO ni AP en las muestras de suelo analizadas, bien porque no se encontraban o porque su concentración está por debajo de los límites de detección de los métodos analíticos desarrollados.

Estos hechos pueden ser consecuencia lógica y directa de las limitaciones

impuestas en la comercialización y uso de estas sustancias, expuestas en la Directiva 2003/53/EC¹ del Parlamento y Consejo Europeo. Esta Directiva ha sufrido diversas modificaciones durante los últimos años como consecuencia de la evolución de la normativa comunitaria en la materia y de la necesidad de incrementar los niveles de protección de la salud humana y del medio ambiente.

¹ Directiva 2003/53/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 18 de junio de 2003, por la que se modifica por vigesimosexta vez la Directiva 76/769/CEE del Consejo respecto a la limitación de la comercialización y el uso de determinadas sustancias y preparados peligrosos (nonilfenol, etoxilatos de nonilfenol y cemento).

3.2 - Experiencia de campo

Al igual que todos los estudios de campo de la presente Memoria de Doctorado, éste se llevó a cabo en la Huerta de Santa María, situada en la Vega de Granada. Como ya se ha comentado, la parcela consta de varias subparcelas experimentales, una de las cuales, de 4 m² de extensión, se ha utilizado para los ensayos de esta investigación.

Este estudio se realizó con el objetivo de evaluar el comportamiento de los tensioactivos alquilfenoles etoxilados en un ambiente natural, donde pueden ser aportados por diferentes mecanismos, siendo empleada para esta finalidad la irrigación forzada con agua que contenía Igepal CA-520 e Igepal CA-210. A diferencia del estudio de campo desarrollado en el **apartado 4.3 del Capítulo 3** de esta Memoria, éste consta del análisis de muestras de suelo a distintas profundidades. La baja solubilidad de las mezclas Igepal usadas en agua y su tendencia a adsorberse en materia particulada es la razón por la cual la matriz seleccionada para su análisis en este estudio de campo es el suelo.

Las muestras de suelo se extrajeron perforando de forma manual con una barrena helicoidal de tipo *Eijkelpamp*. Se colectaron desde la superficie (2 cm aproximadamente) hasta 60 cm de profundidad, a intervalos de 10 cm. Como convenio en la presente Memoria, al referirse a la toma de muestra a diferentes profundidades, se procuró seleccionar una muestra representativa de cada tramo, de tal forma que por ejemplo cuando se emplea el término “profundidad a 20 cm”, significa que ésta fue la profundidad máxima excavada y que se refiere a todo el tramo que abarca desde los 10 hasta los 20 cm.

Las características físicas y químicas de las matrices involucradas en el estudio (agua de riego y suelo) se encuentran recogidas en el **apartado 4.2 del Capítulo 3**.

El primer día de estudio se procedió a regar la parcela hasta inundarla con agua (aproximadamente 140 L) que contenía 40 gramos de Igepal CA-520 y 100 gramos de Igepal CA-210, siendo la dosis aplicada de $10 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$ de Igepal CA-520 y $25 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$ de Igepal CA-210. El resto de riegos se realizaron con la misma cantidad de agua, pero libre de analitos, llevando a cabo 2 riegos al día (espaciados 12 horas aproximadamente) durante los 7 días siguientes a la aplicación y a partir de aquí 1 riego diario hasta el final del estudio. En la **Tabla 4.35** se presenta un esquema de las tomas de muestra efectuadas:

Tabla 4.38 - Tomas de muestra en la parcela experimental.

<i>Nº de toma</i>	<i>Horas transcurridas desde la aplicación</i>	<i>Nº de toma</i>	<i>Horas transcurridas desde la aplicación</i>
1	8	8	199
2	22	9	390
3	31	10	549
4	46	11	693
5	55	12	885
6	79	13	1053
7	151		

El procedimiento seguido fue el siguiente: cada muestra de suelo colectada (**Figura 4.29**) se introdujo en una bolsa de plástico, añadiendo aproximadamente un 1 % (m/v) de formaldehído. Una vez trasladadas las muestras al laboratorio, se secaron a temperatura ambiente en una cámara

de extracción de gases durante aproximadamente 24 horas. Posteriormente se uniformó el tamaño de partícula pasando el suelo través de tamices en serie (de nº 5, nº 14 y nº 30), obteniéndose así un suelo con partículas del tamaño de hasta 0.597 mm de diámetro, como máximo. Finalmente las muestras se introdujeron en frasco estériles y se almacenaron en un refrigerador a una temperatura aproximada de 4 °C, hasta el momento del análisis.



Figura 4.29 - Colecta de las muestras de suelo en la parcela agrícola.

En las **Tablas 4.39** a **4.48** se muestran los valores de concentraciones de alquilfenoles etoxilados encontrados, mediante LC-FD en cada una de las colectas realizadas. En las primeras colectas de muestra a 0 y 10 cm fue necesario diluir el extracto final 100 ó 10 veces debido a la elevada concentración en la que se encontraban los compuestos.

Tabla 4.41 - Concentración de alquilfenoles etoxilados en suelo pasadas 31 horas desde la aplicación.

Concentración en ng·g ⁻¹							
cm	4- <i>t</i> -OP ₁ EO	4- <i>t</i> -OP ₂ EO	4- <i>t</i> -OP ₃ EO	4- <i>t</i> -OP ₄ EO	4- <i>t</i> -OP ₅ EO	4- <i>t</i> -OP ₆ EO	4- <i>t</i> -OP ₇ EO
0	203200	77691	82289	102080	69489	61621	37671
10	2501	1261	2940	5343	4619	3996	2886
20	6229	2838	4701	5779	4493	3114	2105
30	954	413	708	834	643	427	392
40	502	253	498	580	446	291	291
50	1010	420	693	767	559	356	316
60	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD

Tabla 4.42 - Concentración de alquilfenoles etoxilados en suelo pasadas 46 horas desde la aplicación.

Concentración en ng·g ⁻¹							
cm	4- <i>t</i> -OP ₁ EO	4- <i>t</i> -OP ₂ EO	4- <i>t</i> -OP ₃ EO	4- <i>t</i> -OP ₄ EO	4- <i>t</i> -OP ₅ EO	4- <i>t</i> -OP ₆ EO	4- <i>t</i> -OP ₇ EO
0	99800	45501	85257	76204	62419	41138	29864
10	4809	2262	3952	5354	4791	4057	2917
20	2003	952	1631	2008	1609	1116	762
30	164	73	115	115	104	55	85
40	167	84	142	156	150	91	102
50	200	93	167	192	181	123	131
60	171	72	108	109	102	66	119

Tabla 4.43 - Concentración de alquilfenoles etoxilados en suelo pasadas 55 horas desde la aplicación.

Concentración en ng·g ⁻¹							
cm	4- <i>t</i> -OP ₁ EO	4- <i>t</i> -OP ₂ EO	4- <i>t</i> -OP ₃ EO	4- <i>t</i> -OP ₄ EO	4- <i>t</i> -OP ₅ EO	4- <i>t</i> -OP ₆ EO	4- <i>t</i> -OP ₇ EO
0	110601	41600	76900	56230	47496	32213	23525
10	3900	1689	3233	5113	4686	4112	2431
20	892	478	1282	2175	1959	1680	1038
30	710	359	837	1377	1277	1019	519
40	157	79	189	324	294	149	88
50	1453	626	854	1100	869	557	322
60	916	346	394	495	399	55	60

Tabla 4.44 - Concentración de alquilfenoles etoxilados en suelo pasadas 79 horas desde la aplicación.

Concentración en ng·g ⁻¹							
cm	4- <i>t</i> -OP ₁ EO	4- <i>t</i> -OP ₂ EO	4- <i>t</i> -OP ₃ EO	4- <i>t</i> -OP ₄ EO	4- <i>t</i> -OP ₅ EO	4- <i>t</i> -OP ₆ EO	4- <i>t</i> -OP ₇ EO
0	95101	69000	62915	63780	41810	19080	11657
10	680	720	1551	3322	1501	453	350
20	455	526	767	566	311	120	56
30	181	146	252	201	186	74	57
40	2654	1523	2596	2173	1400	693	408
50	100	60	72	< LD	55	< LD	39
60	88	50	48	180	48	< LD	< LD

A modo de ejemplo, en la **Figura 4.30** se muestra el cromatograma correspondiente a la muestra colectada a 30 cm de profundidad pasadas 79 horas desde la aplicación.

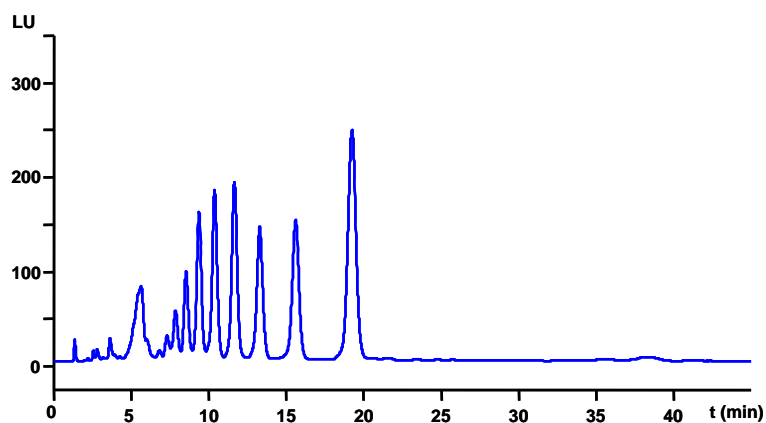


Figura 4.30 - Cromatograma de la muestra colectada a 30 cm de profundidad, 79 horas después de la aplicación.

En las **Figuras 4.31** a **4.37** se muestra la evolución en la concentración de cada compuesto para cada una de las profundidades estudiadas.

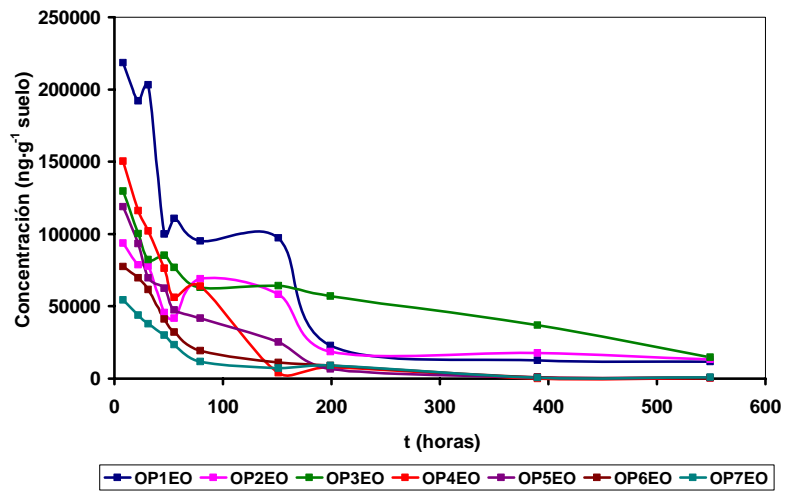


Figura 4.31 - Evolución de la concentración de alquifenoles etoxilados en superficie.

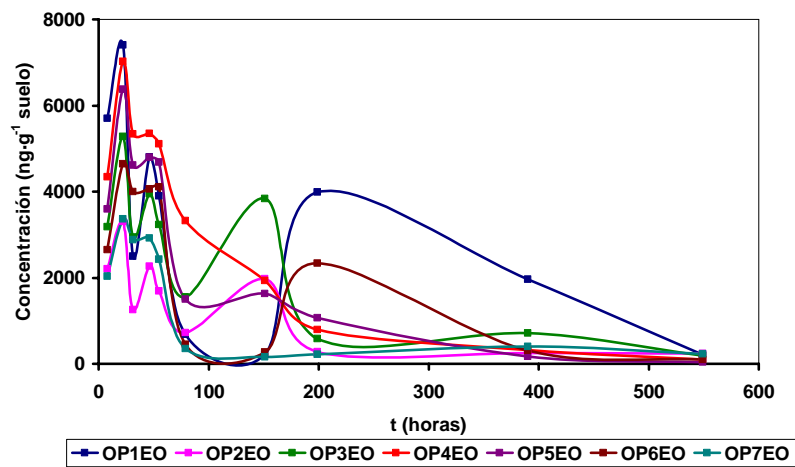


Figura 4.32 - Evolución de la concentración de alquifenoles etoxilados a 10 cm de profundidad.

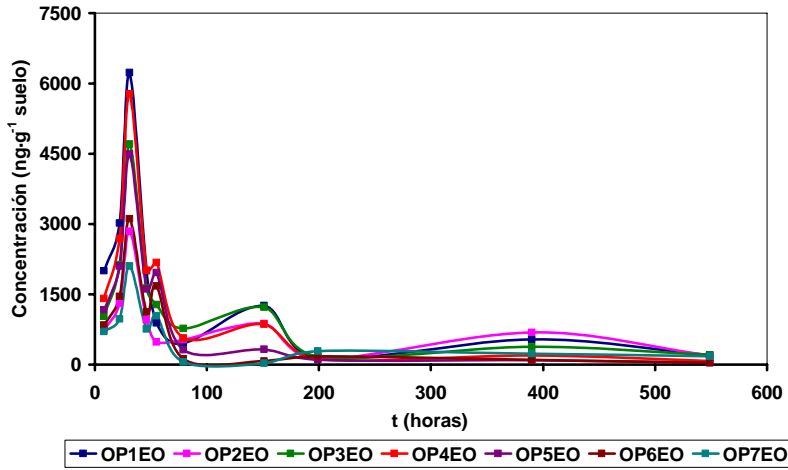


Figura 4.33 - Evolución de la concentración de alquilfenoles etoxilados a 20 cm de profundidad.

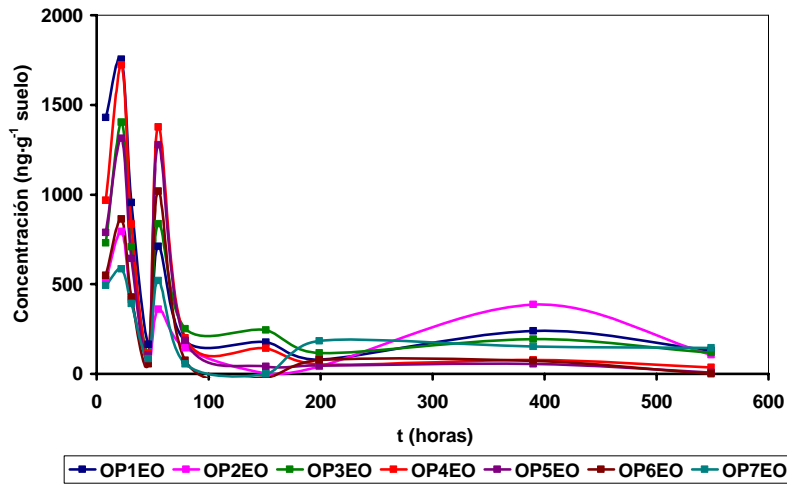


Figura 4.34 - Evolución de la concentración de alquilfenoles etoxilados a 30 cm de profundidad.

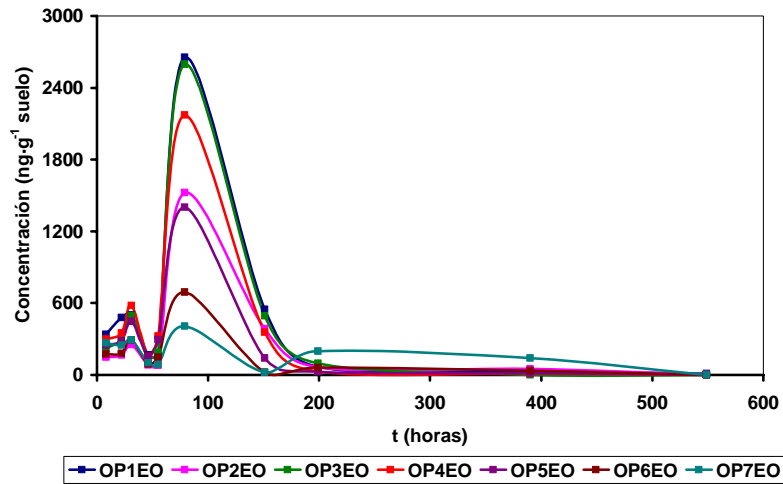


Figura 4.35 - Evolución de la concentración de alquilfenoles etoxilados a 40 cm de profundidad.

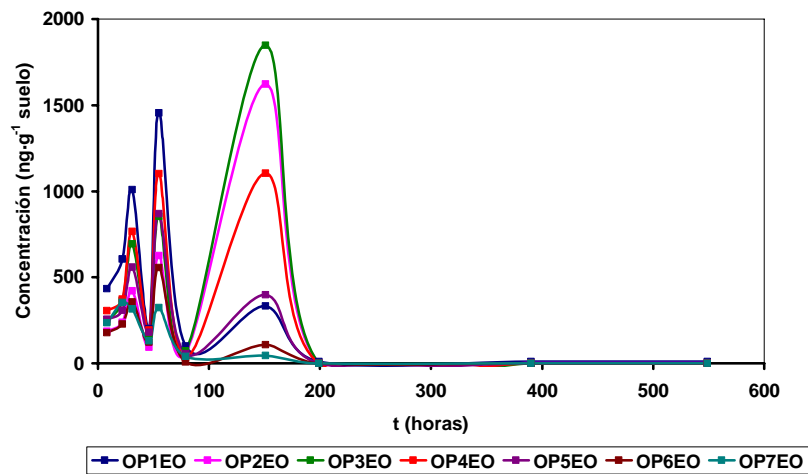


Figura 4.36 - Evolución de la concentración de alquilfenoles etoxilados a 50 cm de profundidad.

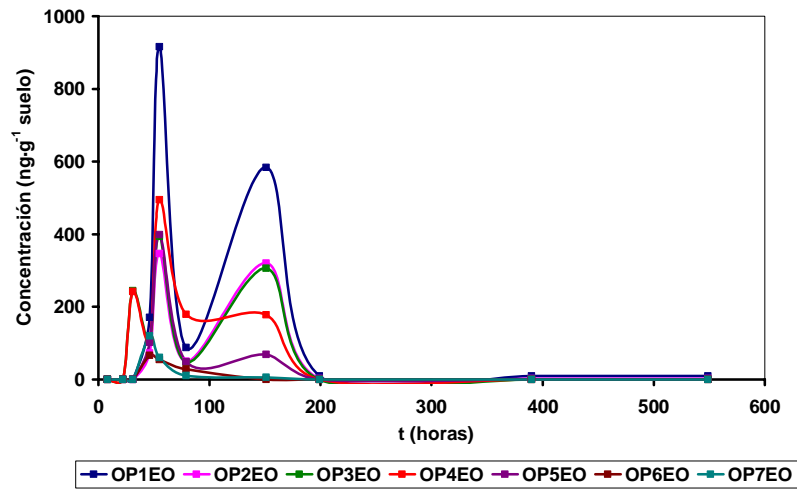


Figura 4.37 - Evolución de la concentración de alquilfenoles etoxilados a 60 cm de profundidad.

A continuación (*Tablas 4.49 a 4.58*) se exponen los resultados de las concentraciones de alquilfenoles etoxilados encontradas mediante GC-MS en cada una de las colectas realizadas:

Tabla 4.51 - Concentración de alquifenoles etoxilados en suelo pasadas 31 horas desde la aplicación.

Concentración en ng·g ⁻¹							
cm	4-t-OP ₁ EO	4-t-OP ₂ EO	4-t-OP ₃ EO	4-t-OP ₄ EO	4-t-OP ₅ EO	4-t-OP ₆ EO	4-t-OP ₇ EO
0	197246	80954	76162	102390	66223	60080	39441
10	2609	1210	2823	5107	4630	3788	2722
20	6196	2842	4879	5571	4323	3207	2008
30	992	429	736	840	671	403	404
40	511	261	489	595	430	285	297
50	1105	411	682	767	571	348	324
60	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD

Tabla 4.52 - Concentración de alquifenoles etoxilados en suelo pasadas 46 horas desde la aplicación.

Concentración en ng·g ⁻¹							
cm	4-t-OP ₁ EO	4-t-OP ₂ EO	4-t-OP ₃ EO	4-t-OP ₄ EO	4-t-OP ₅ EO	4-t-OP ₆ EO	4-t-OP ₇ EO
0	103792	44373	82528	76196	65290	40027	29996
10	4655	2174	4188	5569	4668	4199	2803
20	2081	920	1680	1922	1654	1088	742
30	160	71	117	119	100	53	87
40	162	81	138	151	154	93	99
50	206	90	174	200	176	119	128
60	175	70	110	105	99	68	123

Tabla 4.53 - Concentración de alquilfenoles etoxilados en suelo pasadas 55 horas desde la aplicación.

Concentración en ng·g ⁻¹							
cm	4-t-OP ₁ EO	4-t-OP ₂ EO	4-t-OP ₃ EO	4-t-OP ₄ EO	4-t-OP ₅ EO	4-t-OP ₆ EO	4-t-OP ₇ EO
0	112813	42432	75746	54655	46831	32696	23517
10	4001	1692	3338	5294	4791	4207	2396
20	910	468	1239	2208	1899	1625	1001
30	685	347	870	1342	1221	1052	538
40	162	77	195	330	290	147	90
50	1405	601	866	1133	852	578	311
60	952	331	377	505	387	56	59

Tabla 4.54 - Concentración de alquilfenoles etoxilados en suelo pasadas 79 horas desde la aplicación.

Concentración en ng·g ⁻¹							
cm	4-t-OP ₁ EO	4-t-OP ₂ EO	4-t-OP ₃ EO	4-t-OP ₄ EO	4-t-OP ₅ EO	4-t-OP ₆ EO	4-t-OP ₇ EO
0	97954	67068	61656	62694	43147	19050	11423
10	665	741	1503	3437	1466	440	359
20	466	520	784	555	302	124	55
30	184	144	250	205	182	76	58
40	2690	1520	2488	2099	1451	711	400
50	98	59	74	< LD	54	< LD	< LD
60	90	49	47	183	49	< LD	< LD

A modo de ejemplo, en la **Figura 4.38** aparece el cromatograma correspondiente a la muestra colectada a 10 cm de profundidad pasadas 31 horas desde la aplicación.

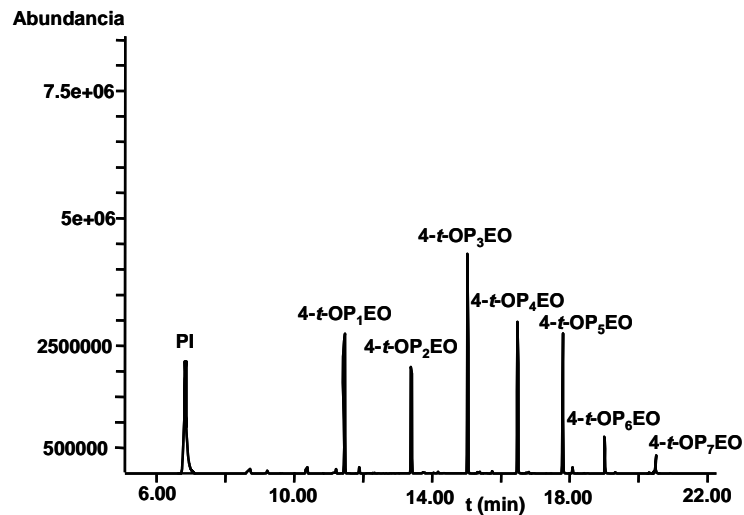


Figura 4.38 - Cromatograma de la muestra colectada 79 horas después de la aplicación a 30 cm de profundidad.

Se compararon los resultados obtenidos con ambos métodos, verificando que la diferencia entre las concentraciones halladas por los mismos no superaba el 5 % en ninguno de los casos.

Del análisis de estos resultados puede concluirse:

- Se verifica que tiene lugar la lixiviación de estos compuestos puesto que han sido detectados incluso a la mayor profundidad estudiada, 60 cm. Como era de esperar, a medida que disminuye el número de unidades etoxiladas (mayor hidrofobicidad) más lenta es la lixiviación.

- No existe evidencia de degradación mediante hidrólisis del enlace éter-fenólico ya que no se ha detectado 4-*t*-OP en ninguna de las muestras colectadas.
- En las figuras donde se muestra la evolución de la concentración de los tensioactivos durante las colectas a distintas profundidades (*Figura 4.31 a 4.37*) aparecen picos que indican un aumento en la concentración de los mismos, más notable en aquellos con un menor número de unidades etoxiladas. Este hecho estaría de acuerdo con la ruta de degradación propuesta por Schröder⁷² según la cual la cadena etoxilada se acorta un mol de etilenglicol en cada paso, permaneciendo unida al resto hidrofóbico. Se observa que también aparecen aumentos en las concentraciones de los compuestos con mayor número de unidades etoxiladas, 4-*t*-OP₆EO y 4-*t*-OP₇EO. Para éstos se debe tener en cuenta que aunque sólo se han cuantificado 4-*t*-OPEO con un máximo de 7 unidades etoxiladas, una de las mezclas usadas en la aplicación contiene oligómeros de hasta 12 unidades, por tanto la degradación de estos compuestos podría explicar el aumento en las concentraciones de los primeros.
- Puesto que se han determinado 4-*t*-OPEO de 1 y 2 unidades etoxiladas a 60 cm de profundidad y estando ampliamente demostrada su persistencia, la desaparición de los mismos con el transcurso del tiempo se debería a su lixiviación, pudiendo estos alcanzar profundidades significativas y, consecuente-

mente, dar lugar a la contaminación de acuíferos y aguas subterráneas. Por tanto, el riego de suelo agrícola con agua residual que contuviera APEO podría implicar un riesgo importante de contaminación medioambiental.

CAPÍTULO 5

**DETERMINACIÓN DE AEO
EN MUESTRAS DE SUELO**

Este capítulo se divide en dos bloques diferenciados:

En el primer bloque, se expone el desarrollo de una metodología analítica de buenas características para la determinación de alcoholes etoxilados lineales en suelos mediante cromatografía de gases con detección de masas.

En el segundo bloque, se muestra la aplicación de dicha metodología, para la determinación de alcoholes etoxilados lineales, en muestras de suelo agrícola colectadas en distintos puntos de la Vega de Granada.

Debido a la gran cantidad de compuestos que suelen formar parte de las mezclas comerciales de AEO y a que no existen patrones comerciales de cada uno de forma individual, para este estudio se seleccionaron los AEO con 12, 14, 16 y 18 átomos de carbono en la cadena carbonada, con 6 y 8 unidades etoxiladas ($C_{12}EO_6$, $C_{12}EO_8$, $C_{14}EO_6$, $C_{14}EO_8$, $C_{16}EO_6$, $C_{16}EO_8$, $C_{18}EO_6$ y $C_{18}EO_8$). La selección se hizo en base a que por una parte, se dispone de ellos comercialmente, y por otra, a que suelen aparecer en altas proporciones en las mezclas de AEO que se emplean tanto a nivel doméstico como industrial.

1 - DESARROLLO DE METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE AEO MEDIANTE GC-MS

El objetivo de este estudio es establecer una metodología analítica de buenas características basada en el uso de GC-MS para llevar a cabo la determinación de AEO en muestras de suelo.

Las etapas de las que consta el método son las siguientes:

- Extracción de los analitos con disolventes presurizados (PLE)
- Purificación y preconcentración mediante extracción en fase sólida.
- Derivatización de los analitos.
- Separación y detección mediante GC-MS.

De forma análoga a lo desarrollado en el **Capítulo 4** de esta Memoria, para la optimización de las variables químicas e instrumentales el orden del protocolo de análisis se modificó. Se comenzó con la optimización de la separación cromatográfica, se continuó con la optimización de la reacción de derivatización, seguidamente con el proceso de purificación y preconcentración y se concluyó con la optimización de las variables influyentes en el procedimiento de extracción con disolventes presurizados.

1.1 - Caracterización de los compuestos mediante GC-MS

A continuación se establecen las características tanto cromatográficas como espectrométricas de los 8 compuestos objeto de estudio. Para ello, en un vial de 7 mL de capacidad se introdujo 1 mL de una disolución metanólica que contenía $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cada uno de los compuestos. Se eliminó el disolvente bajo corriente de N_2 y se añadió 50 μL del reactivo silanzante BSTFA y 50 μL de acetato de etilo que contenía $36 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de acenafteno (sustancia empleada como patrón interno), agitando durante 1 minuto. A continuación se calentó durante 20 minutos a $70 \text{ }^\circ\text{C}$ y completado este tiempo se dejó que la disolución alcanzara temperatura ambiente. Finalmente se trasvasó a un vial cromatográfico provisto de un inserto de vidrio de 200 μL de capacidad para ser analizada mediante GC-MS.

Para la optimización de los parámetros, se ensayaron diferentes temperaturas iniciales de columna (120, 150, y $180 \text{ }^\circ\text{C}$), rampas de temperatura del horno (5, 10 y $15 \text{ }^\circ\text{C} / \text{min}$) y temperaturas finales de columna (290, 300 y $320 \text{ }^\circ\text{C}$).

La selección de las condiciones cromatográficas no se hizo sólo en base a los ocho AEO seleccionados, sino que también se inyectó una disolución conteniendo de 3 mezclas distintas de alcoholes etoxilados para comprobar si el método permitía la separación de alcoholes etoxilados lineales conteniendo un amplio rango de unidades etoxiladas. Las mezclas empleadas en este estudio fueron: **Brij 76** (contiene alcoholes etoxilados lineales con cadena carbonada de 18 átomos de carbono, y una media de 6 unidades etoxiladas); **Brij 56** (contiene alcoholes etoxilados lineales con cadena carbonada de 16 átomos de carbono, y una media de 6 unidades

etoxiladas) y **Alfonic 1412-9** (contiene alcoholes etoxilados lineales con cadena carbonada de 12 y 14 átomos de carbono y una media de 7 unidades etoxiladas). El procedimiento seguido con estas mezclas fue el mismo que con los patrones individuales. En un vial de 7 mL de capacidad se introdujo 1 mL de una disolución metanólica que contenía $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cada una de las mezclas anteriormente mencionadas. Se eliminó el disolvente bajo corriente de N_2 y se añadió 50 μL del reactivo silanzante BSTFA y 50 μL de acetato de etilo que contenía $36 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de acenafteno (sustancia empleada como patrón interno), agitando durante 1 minuto. A continuación se calentó durante 20 minutos a $70 \text{ }^\circ\text{C}$ y completado este tiempo se dejó que la disolución alcanzara temperatura ambiente. Finalmente se trasvasó a un vial cromatográfico provisto de un inserto de vidrio de 200 μL de capacidad para ser analizada mediante GC-MS.

Se seleccionó la rampa más suave ($5 \text{ }^\circ\text{C} / \text{min}$), debido a la mayor resolución de picos obtenida, la temperatura inicial de horno más baja ($120 \text{ }^\circ\text{C}$), por dar lugar a una mejor simetría de los picos iniciales y la temperatura final de columna más elevada ($320 \text{ }^\circ\text{C}$) por ser la que permite obtener un mayor número de picos. En la **Tabla 5.1** se recopilan las variables instrumentales empleadas para la determinación de AEO y a continuación, los cromatogramas obtenidos para las mezclas estudiadas (**Figura 5.1**) y para los ocho patrones individuales de AEO (**Figura 5.2**).

Tabla 5.1 - Variables instrumentales empleadas para la determinación de AEO.

GC		MS	
Variable	Valor	Variable	Valor
Temperatura Inyector	270 °C	Temperatura Interfase	290 °C
Temperatura inicial de la columna	120 °C (5 min)	Rango m/z del espectro de masas	50-1000
Gradiente de temperaturas	5 °C/min, 320 °C (15 min)	Modo	SCAN
Volumen Inyectado	2 µl	Dwell	100 ms

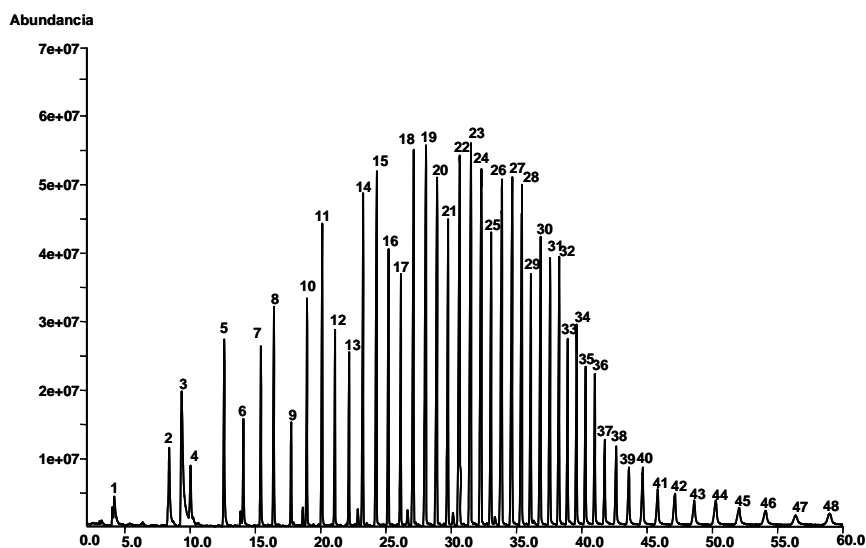


Figura 5.1. Cromatograma en modo Scan de la disolución compuesta por las mezclas Brij 76, Brij 56 y Alfontic 1412-9. La identificación de los picos se presenta en la Tabla 5.2

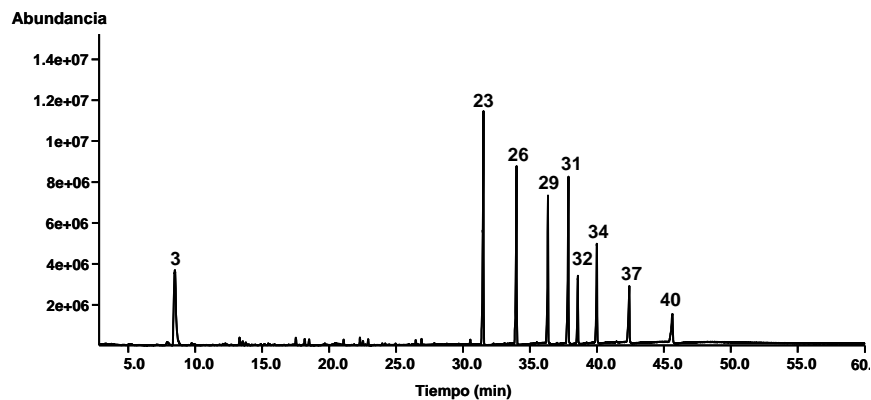


Figura 5.2. Cromatograma en modo Scan de la disolución de los ocho AEO estudiados. La identificación de los picos se presenta en la **Tabla 5.2**

La asignación de todos los picos se realizó inyectando individualmente cada uno de los ocho patrones de AEO. En la **Tabla 5.2** se muestra dicha asignación.

Tabla 5.2. Asignación de los picos cromatográficos de la **Figura 5.1**.

Nº pico	AEO	Nº pico	AEO	Nº pico	AEO	Nº pico	AEO
1	C ₁₂ EO ₀	13	C ₁₆ EO ₂	25	C ₁₆ EO ₅	37	C ₁₆ EO ₈
2	C ₁₄ EO ₀	14	C ₁₄ EO ₃	26	C ₁₄ EO ₆	38	C ₁₄ EO ₉
3	PI	15	C ₁₂ EO ₄	27	C ₁₂ EO ₇	39	C ₁₂ EO ₁₀
4	C ₁₂ EO ₁	16	C ₁₈ EO ₂	28	C ₁₈ EO ₅	40	C ₁₈ EO ₈
5	C ₁₆ EO ₀	17	C ₁₆ EO ₃	29	C ₁₆ EO ₆	41	C ₁₆ EO ₉
6	C ₁₄ EO ₁	18	C ₁₄ EO ₄	30	C ₁₄ EO ₇	42	C ₁₄ EO ₁₀
7	C ₁₂ EO ₂	19	C ₁₂ EO ₅	31	C ₁₂ EO ₈	43	C ₁₂ EO ₁₁
8	C ₁₈ EO ₀	20	C ₁₈ EO ₃	32	C ₁₈ EO ₆	44	C ₁₈ EO ₉
9	C ₁₆ EO ₁	21	C ₁₆ EO ₄	33	C ₁₆ EO ₇	45	C ₁₆ EO ₁₀
10	C ₁₄ EO ₂	22	C ₁₄ EO ₅	34	C ₁₄ EO ₈	46	C ₁₄ EO ₁₁
11	C ₁₂ EO ₃	23	C ₁₂ EO ₆	35	C ₁₂ EO ₉	47	C ₁₂ EO ₁₂
12	C ₁₈ EO ₁	24	C ₁₈ EO ₄	36	C ₁₈ EO ₇	48	C ₁₈ EO ₁₀

A continuación se estudiaron los espectros de masas correspondientes a los picos cromatográficos de los ocho AEO estudiados.

En la **Figura 5.3** aparece el espectro de masas del acenafteno, sustancia usada como patrón interno. El pico de mayor abundancia (masa/carga = 153) corresponde al ión molecular [M-1].

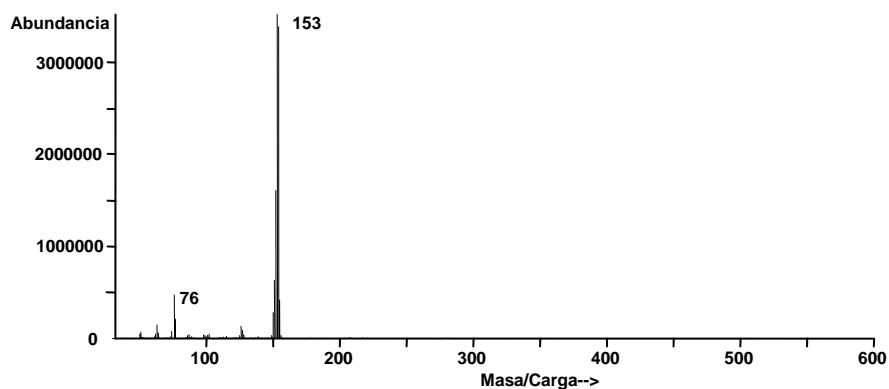


Figura 5.3 - Espectro de masas del acenafteno

En las **Figuras 5.4 a 5.11** se muestran los espectros de masas de los compuestos objeto de estudio. ($C_{12}EO_6$, $C_{12}EO_8$, $C_{14}EO_6$, $C_{14}EO_8$, $C_{16}EO_6$, $C_{16}EO_8$, $C_{18}EO_6$ y $C_{18}EO_8$).

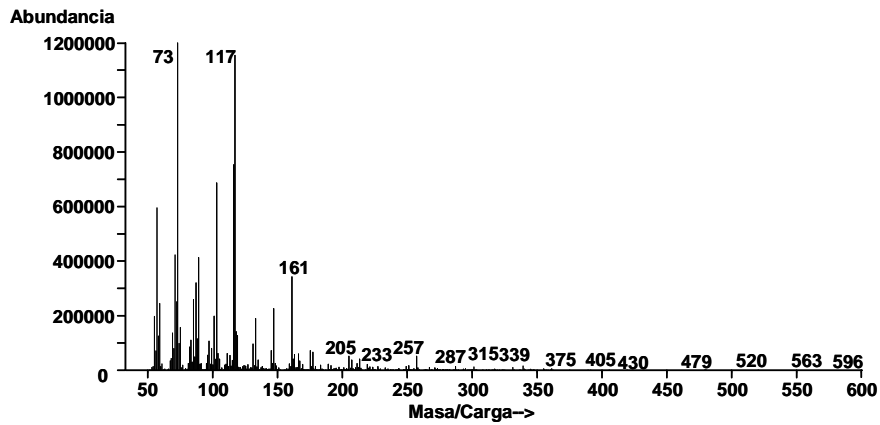


Figura 5.4 - Espectro de masas del $C_{12}EO_6$.

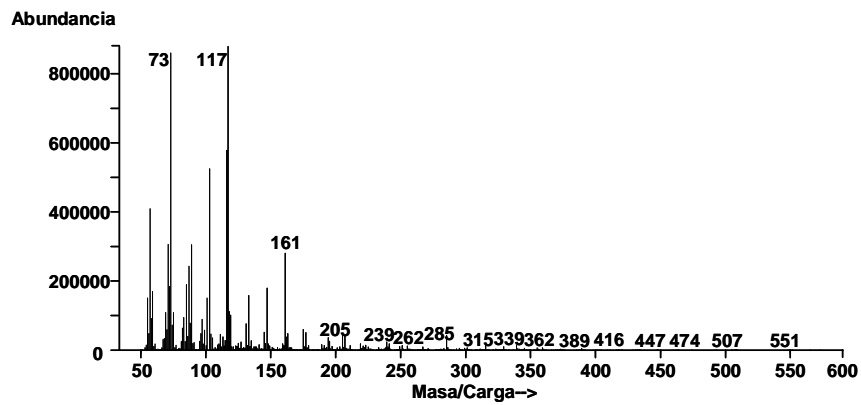


Figura 5.5 - Espectro de masas del $C_{14}EO_6$.

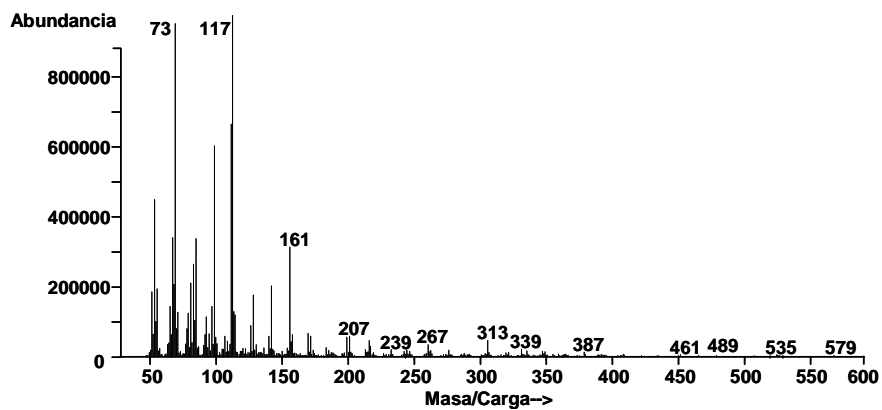


Figura 5.6 - Espectro de masas del $C_{16}EO_6$.

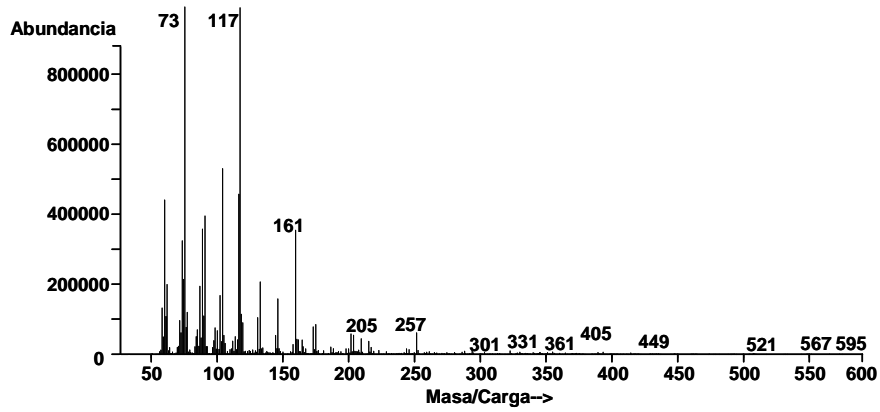


Figura 5.7 - Espectro de masas del $C_{12}EO_8$.

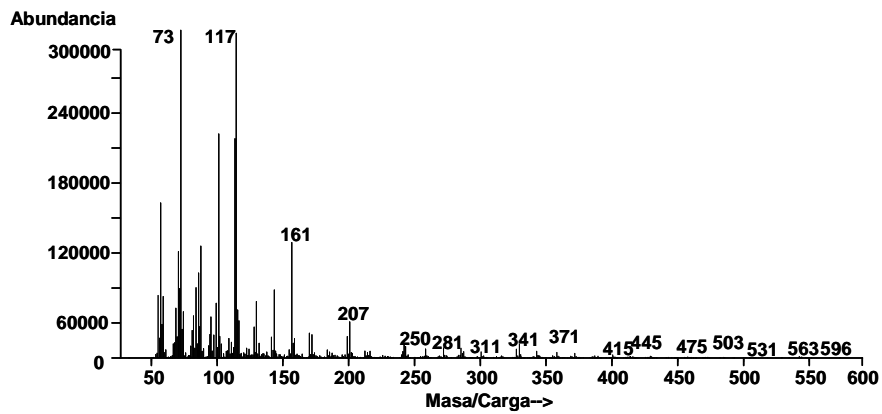


Figura 5.8 - Espectro de masas del $C_{18}EO_6$.

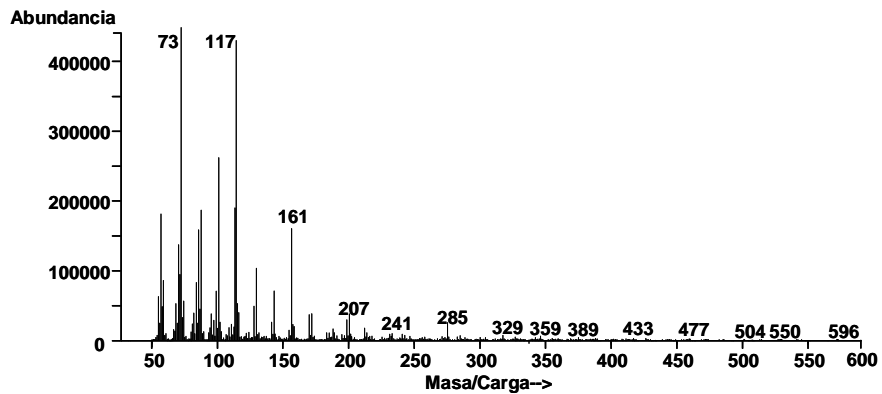


Figura 5.9 - Espectro de masas del $C_{14}EO_8$.

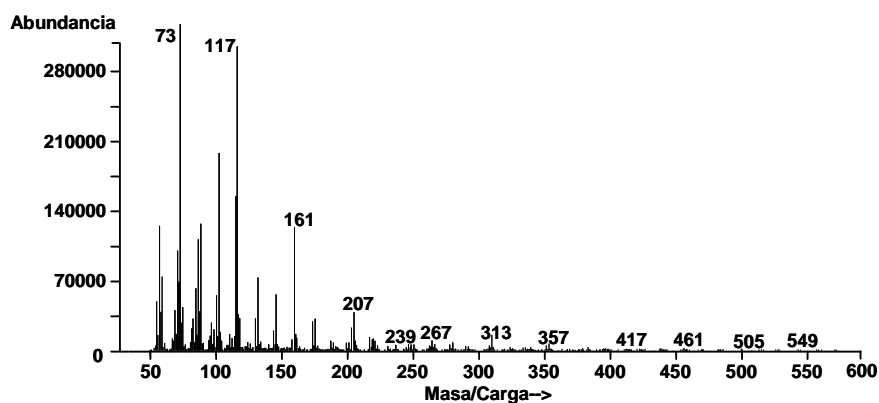


Figura 5.10 - Espectro de masas del C₁₆EO₈.

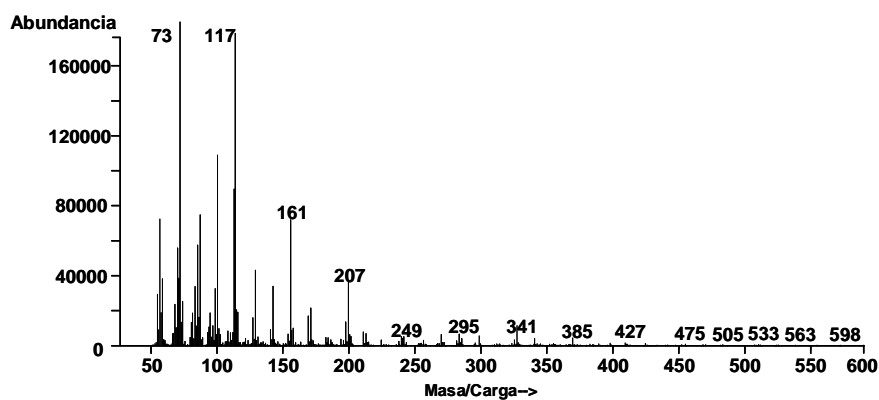


Figura 5.11 - Espectro de masas del C₁₈EO₈.

En todos los espectros de masas se observa un alto grado de fragmentación debido a la estructura simple de la molécula. Al no aparecer picos con suficiente abundancia para ser seleccionados como fragmentos característicos, el análisis de AEO deberá llevarse a cabo usando el modo SCAN.

1.2 - Optimización del proceso de derivatización

Para llevar a cabo el proceso de derivatización se empleó una reacción de silanización, usando como agente silanizante BSTFA (con 0.1 % de TMCS). Como se ha comentado con anterioridad en otros capítulos, la silanización es una de las reacciones más utilizadas para la derivatización de moléculas que contienen grupos -OH en su estructura.

Se describe a continuación la influencia de las variables tiempo, temperatura y porcentaje de agente derivatizante. Todos los ensayos se llevaron a cabo introduciendo en un vial de 7 mL de capacidad, 1 mL de una disolución que contenía $10.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cada uno de los AEO estudiados: C_{12}EO_6 , C_{12}EO_8 , C_{14}EO_6 , C_{14}EO_8 , C_{16}EO_6 , C_{16}EO_8 , C_{18}EO_6 , C_{18}EO_8 , eliminando el disolvente bajo corriente de N_2 y reconstituyendo hasta un volumen final de 100 μL , con 50 μL de BSTFA y 50 μL de acetato de etilo (excepto en el estudio de la influencia del porcentaje de BSTFA donde los volúmenes fueron modificados).

1.2.1 - Influencia del tiempo de reacción

Para este estudio se testaron los siguientes tiempos de reacción: 10, 20, 30 y 45 minutos, todos ellos a una temperatura de 70 °C. Los resultados obtenidos se muestran en la *Figura 5.12*.

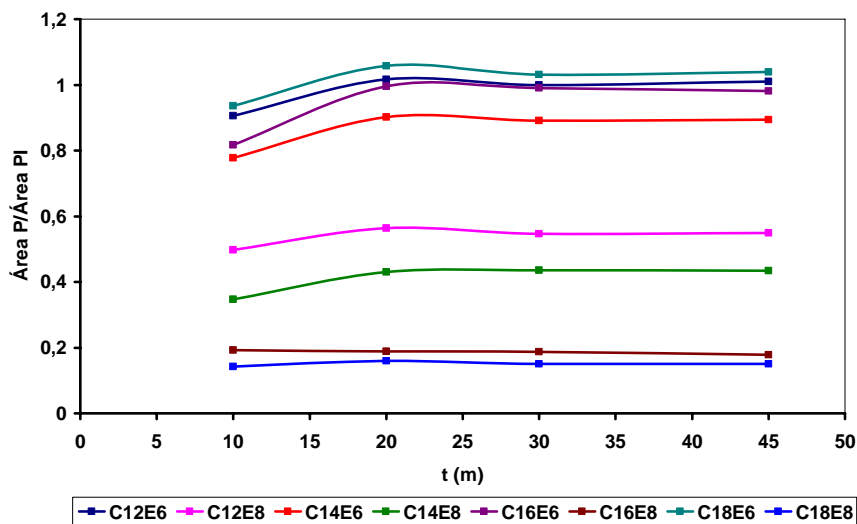


Figura 5.12. Influencia del tiempo en la reacción de silanización

En 6 de los 8 compuestos estudiados se observa un claro incremento de la señal analítica (Área pico/Área PI) al pasar de 10 a 20 minutos de reacción, no experimentando variaciones significativas con tiempos de reacción mayores a 20 minutos. Por su parte, los compuestos $C_{16}E_8$ y $C_{18}E_8$ muestran un comportamiento más lineal. Según lo comentado se seleccionó 20 minutos como tiempo de reacción para obtener la mayor señal analítica posible.

1.2.2 - Influencia de la temperatura de reacción

Para comprobar la influencia de la temperatura en la reacción de silanización de los analitos, se estudió la reacción a seis temperaturas diferentes: Temperatura ambiente, 40 °C, 50 °C, 75 °C y 100 °C

manteniendo fijo el tiempo determinado como óptimo en el apartado anterior (20 minutos). Los resultados se muestran en la **Figura 5.13**.

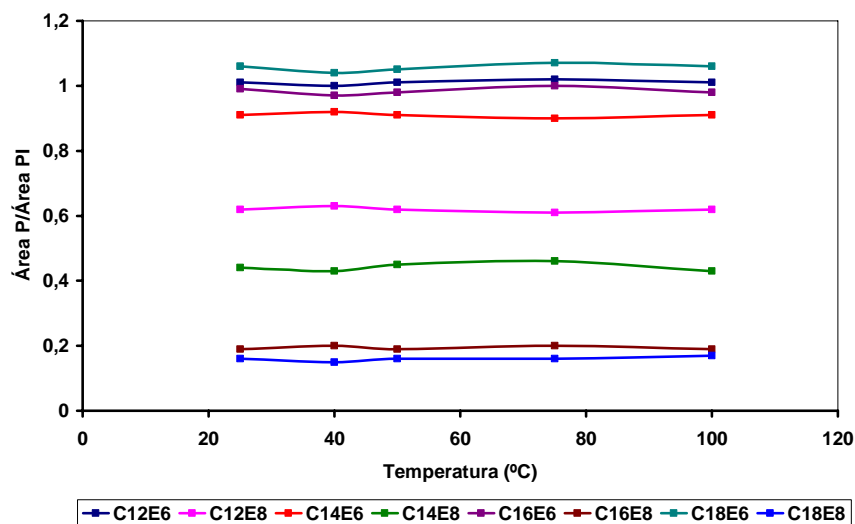


Figura 5.13. Influencia de la temperatura en la reacción de silanización

Según se observa en la figura, la temperatura no es un factor influyente en la reacción de silanización de AEO. Por tanto, la temperatura seleccionada para llevar a cabo la reacción de silanización fue la ambiente.

1.2.3 - Influencia del porcentaje de BSTFA

El estudio de la influencia del porcentaje de BSTFA en la reacción de derivatización se llevó a cabo variando los porcentajes de este agente derivatizante en el rango de 20 a 80 %, manteniendo constantes los valores de tiempo y temperatura optimizados anteriormente (20 minutos y T^a ambiente). El volumen final de la muestra a inyectar fue siempre de 100 μ L y se prepararon distintas concentraciones de acenafeno en acetato

de etilo de forma que la concentración final del mismo siempre fuera $18 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. En la **Figura 5.14** se muestran los resultados obtenidos:

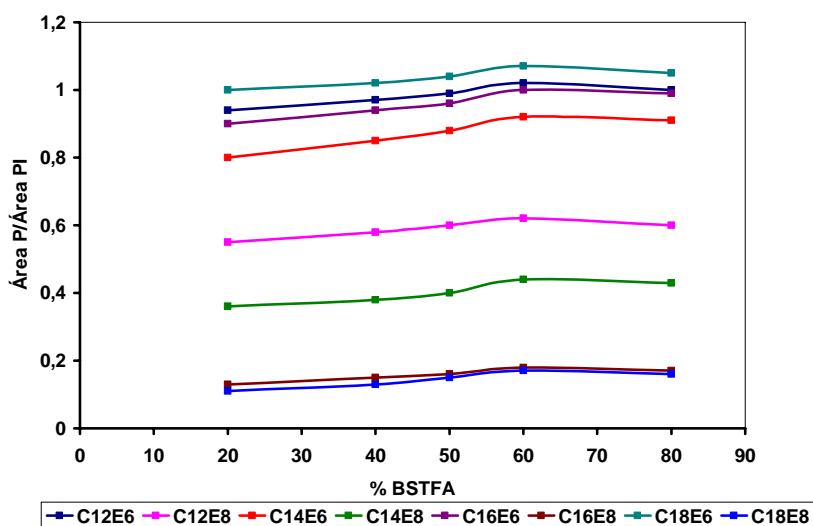


Figura 5.14. Influencia del porcentaje de BSTFA en la reacción de silanización

Según se observa en la figura, la señal analítica alcanza un valor máximo cuando el porcentaje de BSTFA empleado es del 60 % y por tanto este fue el valor seleccionado para llevar a cabo la silanización de los analitos.

1.3 - Selección del procedimiento de extracción en fase sólida.

Debido a la semejanza estructural entre AEO y APEO se estudió la aplicación del procedimiento SPE desarrollado en el **Capítulo 4** a los nuevos analitos estudiados.

A continuación se muestra la **Tabla 4.18** (correspondiente al capítulo anterior) con el objeto de recordar las condiciones optimizadas del procedimiento SPE para APEO:

Tabla 4.18. Condiciones óptimas del procedimiento de SPE para APEO y AP.

Etapa	Procedimiento	Reactivos/condiciones
Extracción en Fase Sólida con cartuchos ENV+	1) Acondicionamiento	5 mL DEE + 5mL MeOH + 5 mL H ₂ O
	2) Carga	100 mL hidrometanólica (H ₂ O:MeOH, 65:35, v/v)
	3) Lavado	5 mL H ₂ O:MeOH (80:20, v/v)
	4) Secado	15 min.
	5) Elución	5 mL DEE:MeOH (90:10, v/v)

Para llevar a cabo el ensayo, se realizó una carga con 100 mL de disolución hidrometanólica (H₂O-MeOH 65:35, v/v) conteniendo 0.1 µg·L⁻¹ de cada uno de los AEO estudiados. Se procedió al análisis de las respectivas razones de áreas de pico cromatográfico (Área /Área patrón interno) y se comparó con el área de los mismos patrones conteniendo la misma concentración pero sin ser sometidos al procedimiento de SPE. A partir de estos datos se obtuvieron los correspondientes valores de recuperación.

Las recuperaciones obtenidas se muestran en la **Tabla 5.3**:

Tabla 5.3. Recuperaciones obtenidas en el procedimiento SPE de AEO.

Analito	Recuperación (%)	Analito	Recuperación (%)
C ₁₂ E ₆	99.1	C ₁₆ E ₆	95.2
C ₁₂ E ₈	101.3	C ₁₆ E ₈	98.6
C ₁₄ E ₆	95.8	C ₁₈ E ₆	100.2
C ₁₄ E ₈	93.7	C ₁₈ E ₈	99.6

Debido a las altas recuperaciones obtenidas, situadas entre el 94 y 101 %, se decidió que el procedimiento SPE desarrollado para APEO era también adecuado para llevar a cabo la purificación y concentración de AEO.

1.4 - Optimización de las variables implicadas procedimiento PLE

El disolvente seleccionado para llevar a cabo la extracción de AEO en suelo mediante PLE fue metanol debido a que por una parte, este fue el disolvente empleado para la extracción de APEO en suelos y por su similitud estructural cabría esperar una buena actuación del mismo y por otra, a que la carga empleada en el procedimiento de extracción en fase sólida consiste en una disolución hidrometanólica y así se evitaría tener que evaporar completamente el extracto obtenido en el procedimiento PLE.

Se estudió a continuación la influencia de las variables tiempo y temperatura de extracción sobre las recuperaciones obtenidas.

En primer lugar se analizó el suelo que se utilizaría en la optimización del procedimiento PLE para verificar que se encontraba libre de los analitos objeto de estudio.

El procedimiento seguido para la optimización del procedimiento PLE fue el siguiente:

- Se pesan 5 gramos de suelo.
- Se fortifica con 2 mL de disolución metanólica conteniendo $5.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cada uno de los AEO estudiados.
- Se deja secar hasta la desaparición del volumen sobrenadante.
- Se introduce en una estufa a 50°C durante 4 horas.
- Se deja enfriar hasta alcanzar temperatura ambiente, quedando la muestra de suelo así lista para ser cargada en la célula de extracción.

1.4.1 - Optimización de la temperatura de extracción

Se ensayaron 5 valores de temperatura: 70, 100, 150, 180 y 200 °C.

Las condiciones iniciales, mostradas en la **Tabla 5.4**, se seleccionaron teniendo en cuenta la bibliografía consultada:

Tabla 5.4 -. Condiciones iniciales seleccionadas para la extracción de AEO mediante PLE.

Variable	Valor
Pre calentamiento	2 min.
Calentamiento	5 min.
Flush	50 %
Tiempo de extracción	5 min
Purga	180 s.
Presión	1500 psi

Las recuperaciones obtenidas con cada una de las temperaturas estudiadas se recogen en la **Figura 5.15**:

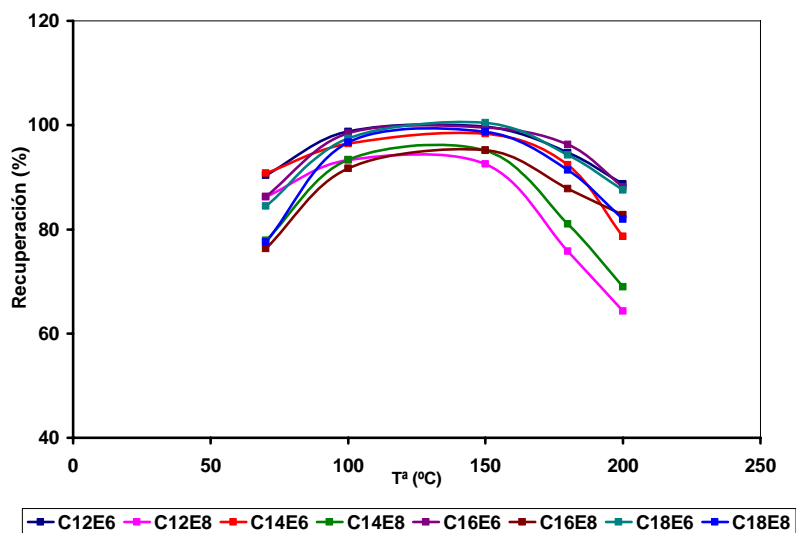


Figura 5.15- Influencia de la temperatura en el procedimiento de PLE

En la figura se observa que las recuperaciones de los ocho AEO estudiados muestran un comportamiento similar, aumentando al incrementar la temperatura de extracción de 70 a 100 °C, permaneciendo aproximadamente constantes en el tramo de temperaturas comprendido entre 100 y 150 °C y disminuyendo a temperaturas superiores a 150 °C, quizá debido a la degradación térmica de los compuestos.

Se seleccionó como temperatura óptima de extracción 125 °C por situarse en el centro del tramo donde las recuperaciones son máximas y permanecen aproximadamente constantes.

1.4.2 - Optimización del tiempo de extracción

A continuación se analizó la influencia que ejerce el tiempo de extracción sobre la recuperación de los analitos. Para ello se realizaron extracciones a cinco tiempos de extracción: 1, 3, 5, 7 y 10 minutos, todas ellas usando como disolvente metanol, como temperatura de extracción 125° C y el resto de condiciones las que aparecen en la *Tabla 5.4*.

Los resultados obtenidos se reflejan en la *Figura 5.16*.

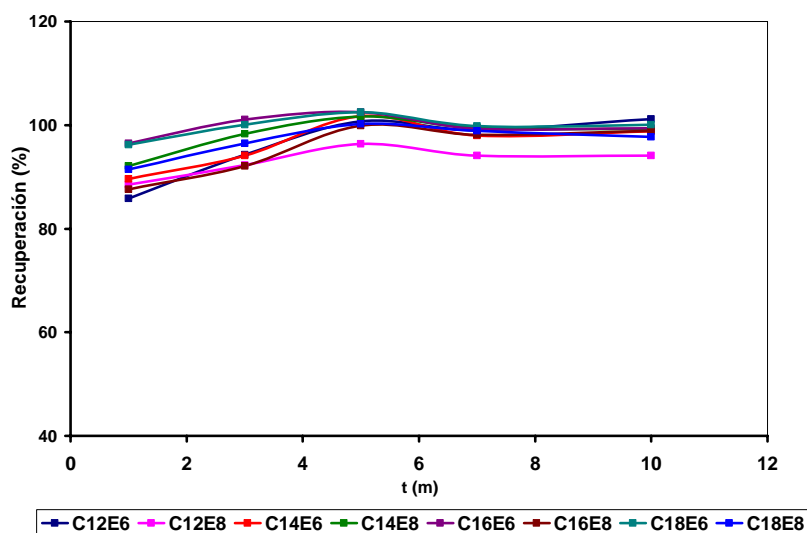


Figura 5.16- Influencia del tiempo de extracción en el procedimiento de PLE.

Para todos los AEO estudiados, la recuperación aumenta al incrementar el tiempo de extracción hasta llegar al valor de 5 minutos. A partir de este tiempo no hay variaciones significativas y por tanto, en orden a minimizar el tiempo empleado en el procedimiento de PLE, se seleccionó 5 minutos como tiempo de extracción.

1.4.3 - Selección del número de ciclos

Se estudió la influencia del número de ciclos sobre la recuperación de los compuestos objeto de estudio. Para ello, se realizaron extracciones empleando 1, 2 y 3 ciclos, utilizando en todas los parámetros optimizados anteriormente (metanol como disolvente de extracción, temperatura 125 °C y tiempo de extracción 5 minutos) y el resto de condiciones las que aparecen en la *Tabla 5.4*.

Los resultados revelaron que no había diferencias significativas en las recuperaciones al usar 1, 2 ó 3 ciclos. Se seleccionó el valor de 1 sólo ciclo para la extracción con objeto de minimizar así el tiempo empleado en el procedimiento PLE.

1.4.4 - Resumen de las condiciones óptimas del procedimiento PLE

En la *Tabla 5.5* se muestran las condiciones optimizadas para el procedimiento de PLE. Estas condiciones serán las empleadas posteriormente para la construcción de la función de calibración, la validación del método y su aplicación a muestras de suelo.

Tabla 5.5 -Condiciones óptimas del procedimiento PLE.

Variable	Valor
Disolvente	MeOH
Pre calentamiento	2 min.
Calentamiento	5 min.
Flush	50 %
Purga	180 s.
Presión	1500 psi
Temperatura	125 °C
Tiempo de extracción	5 min.
Ciclos	1

1.5 - Procedimiento operatorio para el tratamiento de muestras

El procedimiento operatorio seguido para el tratamiento de muestras de suelo es el que se indica a continuación:

El extracto metanólico (aproximadamente 45 mL) obtenido en el proceso de extracción con disolventes presurizados se evapora en rotavapor hasta un volumen igual o menor a 35 mL. Se trasvasa a una probeta y se completa con el volumen necesario de MeOH hasta 35 mL. A continuación se trasvasa a un matraz de 100 mL, completando el volumen con agua destilada. Estos 100 mL constituyen la carga hidrometanólica del procedimiento SPE.

Tras llevar a cabo el procedimiento SPE se obtiene un volumen de eluato de 5 mL, que seca bajo corriente de nitrógeno a temperatura ambiente.

Una vez evaporado completamente, el extracto se disuelve, agitando durante un minuto, con 40 μL de acetato de etilo conteniendo 45 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de acenafteno más 60 μL del agente derivatizante BSTFA. Se deja reposar el vial 5 minutos a temperatura ambiente para que se complete la reacción de silanización, se agita durante 1 minuto y finalmente se trasvasa el extracto a un vial cromatográfico con inserto de vidrio de 200 μL de capacidad para su análisis mediante GC-MS.

De esta forma, además purificar la muestra, el procedimiento SPE permite concentrar los analitos 1000 veces (el volumen inicial es 100 mL y el final 100 μL). A lo largo del tratamiento de muestra, el factor de concentración de los analitos final es de 50, ya que se parte de 5 gramos de suelo y el volumen final del extracto es 100 μL .

1.6 - Parámetros analíticos del método desarrollado

A continuación se desarrollan los parámetros analíticos obtenidos a partir de los datos experimentales.

1.6.1 - Establecimiento y verificación del modelo

El modelo de calibración seleccionado fue el lineal de regresión univariante por mínimos cuadrados. Como patrón interno se usó el acenafteno, construyendo las correspondientes curvas de calibración usando el cociente de áreas analito/patrón interno, frente a concentración de analito.

En primer lugar se comprobó la existencia o no de efecto matriz comparando los datos de un calibrado hecho con disoluciones patrones y uno con la matriz estudiada a través de un test estadístico (comparación de pendientes *b*).

Para establecer la curva de calibración de patrones, se prepararon una serie de matraces de 5.0 mL, en los que se introdujeron volúmenes crecientes de las disoluciones patrón y se enrasaron con MeOH. De cada matraz se pipeteó 100 μL , se depositó en un vial de 4 mL y se llevó a sequedad bajo corriente de nitrógeno a temperatura ambiente. Posteriormente se reconstituyó con 40 μL de acetato de etilo conteniendo 45 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de patrón interno y 60 μl de BSTFA, agitando 1 minuto y dejando reposar 20 minutos para completar la reacción de derivatización.

Se prepararon 6 niveles de concentración, de 5.0 a 100.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para los AEO con 6 unidades etoxiladas (C_{12}EO_6 , C_{14}EO_6 , C_{16}EO_6 y C_{18}EO_6); de 10.0 a 200.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para el C_{12}EO_8 ; de 15.0 a 150.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para el C_{14}EO_8 ; de 20.0 a 400.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para el C_{16}EO_8 ; y de 25.0 a 500.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para el C_{18}EO_8 . De cada punto se realizaron tres réplicas experimentales y dos instrumentales.

En la **Tabla 5.6** se muestran los resultados obtenidos:

Tabla 5.6 - Parámetros del calibrado realizado con los patrones AEO.

Analito	b (ng·mL ⁻¹)	S _b	a	S _a	R ² (%)	S _{x/y}	P _{lot} (%)
C ₁₂ EO ₆	8.2·10 ⁻⁶	8.2·10 ⁻⁸	-4.0·10 ⁻²	3.7·10 ⁻³	99.93	1.5·10 ⁻²	7.25
C ₁₂ EO ₈	4.1·10 ⁻⁶	5.3·10 ⁻⁸	-3.3·10 ⁻²	5.2·10 ⁻³	99.85	2.1·10 ⁻²	42.54
C ₁₄ EO ₆	7.0·10 ⁻⁶	7.4·10 ⁻⁸	-3.4·10 ⁻²	3.3·10 ⁻³	99.91	1.3·10 ⁻²	8.35
C ₁₄ EO ₈	2.6·10 ⁻⁶	3.1·10 ⁻⁸	-3.8·10 ⁻²	3.9·10 ⁻³	99.91	1.5·10 ⁻²	10.51
C ₁₆ EO ₆	5.4·10 ⁻⁶	8.2·10 ⁻⁸	-2.7·10 ⁻²	4.0·10 ⁻³	99.80	1.6·10 ⁻²	14.72
C ₁₆ EO ₈	1.9·10 ⁻⁶	3.1·10 ⁻⁸	-3.0·10 ⁻²	5.7·10 ⁻³	99.79	2.3·10 ⁻²	71.69
C ₁₈ EO ₆	3.8·10 ⁻⁶	6.2·10 ⁻⁸	-1.3·10 ⁻²	2.7·10 ⁻³	99.81	1.1·10 ⁻²	79.30
C ₁₈ EO ₈	1.2·10 ⁻⁶	1.3·10 ⁻⁸	-3.7·10 ⁻²	3.2·10 ⁻³	99.91	1.3·10 ⁻²	9.15

Para las muestras de suelo fortificadas, las funciones de calibración se establecieron siguiendo el procedimiento que se describe a continuación: se prepararon una serie de tubos, pesando 5.0 gramos de suelo y fortificándolo el día anterior al análisis (aproximadamente 24 horas antes). Se dejó evaporar el volumen sobrenadante y se metió en una estufa a 50 ° C durante 4 horas. Para cada AE se prepararon 6 niveles de concentración de 0.100.0 a 2000.0 ng·g⁻¹ para los AEO con 6 unidades etoxiladas (C₁₂EO₆, C₁₄EO₆, C₁₆EO₆ y C₁₈EO₆); de 200.0 a 4000.0 ng·g⁻¹ para el C₁₂EO₈; 300.0 y 6000.0 ng·g⁻¹ para el C₁₄EO₈; de 400.0 a 8000.0 µg·g⁻¹ para el C₁₆EO₈; y de 500.0 a 10000.0 µg·g⁻¹ para el C₁₈EO₈. Cada una de las concentraciones se preparó por triplicado y cada punto se analizó instrumentalmente por duplicado. Se siguieron los procedimientos de extracción con disolventes presurizados, extracción en fase sólida y cromatográficos anteriormente descritos.

La curva de calibración se construyó utilizando el cociente área analito/área patrón interno, frente a concentración de analito.

Los parámetros estadísticos del modelo para el método de determinación de AEO en muestras de suelo mediante GC-MS, son los que se muestran en la *Tabla 5.6*.

Tabla 5.7 - Parámetros estadísticos para la determinación de AEO en suelos mediante GC-MS.

Analito	b ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	S _b	a	S _a	R ² (%)	S _{x/y}	P _{1of} (%)
C ₁₂ EO ₆	3.3·10 ⁻⁴	3.8·10 ⁻⁶	-1.8·10 ⁻²	3.7·10 ⁻³	99.93	1.5·10 ⁻²	10.07
C ₁₂ EO ₈	8.7·10 ⁻⁵	7.5·10 ⁻⁷	-1.1·10 ⁻²	1.5·10 ⁻³	99.93	5.8·10 ⁻³	8.82
C ₁₄ EO ₆	2.1·10 ⁻⁴	1.2·10 ⁻⁵	-2.7·10 ⁻²	2.2·10 ⁻³	99.17	3.5·10 ⁻³	27.12
C ₁₄ EO ₈	3.4·10 ⁻⁵	2.4·10 ⁻⁷	-3.9·10 ⁻²	7.1·10 ⁻⁴	99.95	2.8·10 ⁻³	9.69
C ₁₆ EO ₆	1.6·10 ⁻⁴	1.8·10 ⁻⁶	-4.1·10 ⁻²	1.7·10 ⁻³	99.89	6.9·10 ⁻³	83.90
C ₁₆ EO ₈	2.8·10 ⁻⁵	1.7·10 ⁻⁷	-8.3·10 ⁻²	7.2·10 ⁻⁴	99.97	2.7·10 ⁻³	27.50
C ₁₈ EO ₆	6.1·10 ⁻⁵	8.9·10 ⁻⁷	3.6·10 ⁻²	9.0·10 ⁻⁴	99.82	3.4·10 ⁻³	55.19
C ₁₈ EO ₈	2.1·10 ⁻⁵	1.6·10 ⁻⁷	-2.6·10 ⁻²	8.1·10 ⁻⁴	99.95	3.1·10 ⁻³	86.61

Comparando las *Tablas 5.6* y *5.7* se aprecia que las pendientes de las curvas de calibración para el suelo son inferiores a las pendientes del calibrado con patrones teniendo en cuenta que en el tratamiento de muestras éstas son concentradas 50 veces.

Al comparar las pendientes se comprobó que había diferencia significativa para todos los compuestos estudiados. También se constató que las ordenadas eran significativamente diferentes por lo cual, para cada compuesto, había dos rectas de calibrado diferentes y no paralelas

poniendo de manifiesto la existencia del efecto matriz. Según lo dicho, la cuantificación de alcoholes etoxilados en suelo agrícola se llevó a cabo usando las funciones de calibración obtenidas con muestras fortificadas.

Para la verificación del modelo, se tuvieron en cuenta dos parámetros:

1) Evaluación del fallo de ajuste (P_{Lof}): para determinar la tendencia lineal de los datos:

En la **Tabla 5.7** se observa en que en todos los casos el valor P obtenido fue mayor del 5%, por tanto se concluye por la existencia de linealidad, es decir, los datos se ajustan al modelo lineal seleccionado.

2) Evaluación de la condición de *homocedasticidad*, es decir, homogeneidad de varianzas.

Para esta finalidad se empleó el análisis gráfico de los residuos. Mediante este análisis se observó que se cumplían las premisas fijadas en todos los casos. Por tanto, se puede afirmar que los datos son homocedásticos.

2.6.2 - Parámetros de calidad del método analítico

2.6.2.1 - Límite de detección y cuantificación

Para el cálculo de estos parámetros se utilizó la metodología basada en la función de calibrado, descrita en la opción **b** del apartado **5.3.4** del **Capítulo Experimental: Materiales y Métodos**.

Los resultados se presentan en la **Tabla 5.8**.

Tabla 5.8 - Límites de detección y cuantificación para la determinación de AEO mediante GC-MS.

Analito	LD (ng·g ⁻¹)	LQ (ng·g ⁻¹)
C ₁₂ EO ₆	16	53
C ₁₂ EO ₈	44	145
C ₁₄ EO ₆	18	60
C ₁₄ EO ₈	66	221
C ₁₆ EO ₆	25	84
C ₁₆ EO ₈	90	301
C ₁₈ EO ₆	28	94
C ₁₈ EO ₈	117	391

2.6.2.2 - Rango dinámico lineal y Linealidad

En la **Tabla 5.9** se muestran los valores obtenidos para el rango dinámico lineal (RDL), la linealidad (LIN), la desviación estándar relativa (DER) y la sensibilidad analítica (S_{analítica}).

Tabla 5.9 - RDL, LIN on line, DER y $S_{analítica}$ para la determinación de AEO.

Analito	RDL ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$)	LIN (%)	DER (%)	$S_{analítica}$ ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$)
C_{12}EO_6	53-2000	99.11	0.88	34.27
C_{12}EO_8	145-4000	99.13	0.87	67.34
C_{14}EO_6	60-2000	98.46	1.54	16.41
C_{14}EO_8	221-6000	99.29	0.71	82.55
C_{16}EO_6	84-2000	98.86	1.14	44.09
C_{16}EO_8	301-8000	99.37	0.63	96.91
C_{18}EO_6	94-2000	98.54	1.46	56.49
C_{18}EO_8	391-10000	99.24	0.76	147.7

En todos los casos la linealidad “on line” es superior al 95%. Se puede, por tanto, afirmar que los datos experimentales se ajustan al modelo lineal propuesto.

2.6.2.3 - Precisión

Con el fin de evaluar la precisión del método analítico se estimó la repetibilidad intra- e inter- día. Para ello se fortificaron muestras de blanco de suelo a tres niveles de concentración de cada AEO (250.0, 500.0 y 1500.0 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de C_{12}EO_6 , C_{14}EO_6 , C_{16}EO_6 y C_{18}EO_6 ; 500.0, 1000.0 y 3000.0 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de C_{12}EO_8 ; 750.0, 1500.0 y 4500.0 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de C_{14}EO_8 ; 1000.0, 2000.0 y 6000.0 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de C_{16}EO_8 y 1250.0, 2500.0 y 7500.0 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de C_{18}EO_8), llevando a cabo 6 análisis (3 réplicas experimentales y 2 réplicas instrumentales) de cada concentración, cada uno de los 3 días del estudio.

Las muestras se trataron mediante el procedimiento de extracción con disolventes presurizados y de extracción en fase sólida ya descritos con

anterioridad y se inyectaron en el cromatógrafo de gases fijando las condiciones instrumentales habituales.

La recuperación se evaluó comparando las relaciones de área de las muestras fortificadas con las razones de área proporcionadas por muestras de suelo no fortificadas que se sometieron a todo el proceso (extracción, purificación, concentración) añadiendo el correspondiente patrón disuelto en el acetato de etilo (que contiene también el patrón interno) usado como medio de reacción en la derivatización. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 5.10**.

Tabla 5.10 - Recuperaciones (%) intra e interdía y precisión (RSD, %)*

* Media de seis determinaciones. RSD (%), desviación estándar relativa.

Analito	Nivel ng·g ⁻¹	Recuperaciones (%) y precisión (RSD, %)		
		1	2	3
C ₁₂ EO ₆	250.0	99 (2)	100 (1)	101 (2)
	500.0	98 (2)	99 (1)	101 (2)
	1500.0	101 (2)	99 (1)	99 (1)
C ₁₂ EO ₈	500.0	100 (2)	99 (1)	101 (2)
	1000.0	99 (1)	98 (1)	99 (1)
	3000.0	101 (1)	99 (2)	98 (2)
C ₁₄ EO ₆	250.0	101 (2)	100 (1)	98 (2)
	500.0	99(1)	99 (2)	99 (1)
	1500.0	101 (2)	100 (1)	99 (2)
C ₁₄ EO ₈	750.0	99 (1)	100 (1)	101 (2)
	1500.0	99 (2)	101 (2)	100 (1)
	4500.0	98 (2)	99 (2)	101 (1)
C ₁₆ EO ₆	250.0	99 (2)	100 (2)	101 (1)
	500.0	99 (1)	99(2)	101 (2)
	1500.0	100 (2)	99 (2)	99 (2)
C ₁₆ EO ₈	1000.0	99 (2)	99 (2)	101 (2)
	2000.0	99 (2)	100 (2)	99 (1)
	6000.0	100 (2)	101 (1)	99 (3)
C ₁₈ EO ₆	250.0	98 (2)	99 (2)	98 (2)
	500.0	100 (2)	98 (3)	102 (2)
	1500.0	99 (1)	99 (1)	99 (1)
C ₁₈ EO ₈	1250.0	99 (2)	98 (2)	101 (2)
	2500.0	98 (2)	101 (1)	100 (2)
	7500.0	100 (1)	99 (1)	100 (1)

En todos los casos, la desviación estándar relativa es menor del 10 % y se puede concluir que el método propuesto suministra resultados muy próximos entre sí y, por lo tanto, cumple con los requisitos de precisión.

2.6.2.4 - Sensibilidad o Resolución analítica

De acuerdo con los datos experimentales obtenidos, las resoluciones analíticas calculadas para cada componente se expresan la *Tablas 5.9*.

2.7 - Validación del método desarrollado

La validación de la metodología propuesta para la determinación de AEO por cromatografía de gases-espectrometría de masas se llevó a cabo usando muestras de suelo, procedente de la zona no saturada de una parcela agrícola de la Vega de Granada. Previamente se confirmó que este suelo estaba libre de los analitos objeto de estudio.

Las muestras para llevar a cabo la validación se prepararon usando 5 gramos de suelo fortificado en los mismos niveles de concentración que los que se emplearon para el calibrado. El suelo se sometió a los procesos de extracción/purificación/concentración.

A continuación, la validación del método para estas muestras de suelo se llevó a cabo usando el test de recuperación de **t-Student**. Los resultados obtenidos se presentan a en la *Tabla 5.11*.

Tabla 5.11 - Veracidad del método. Determinaciones a diferentes niveles de concentración de cada AEO, medidas en 3 días (n=15 para cada día).

AEO	Veracidad				
	Conc. añadida ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Conc. encontrada ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Rec. (%)	$t_{\text{calc.}}$	P (%)
C_{12}EO_6	250	252.0 ± 3.1	100	1.04	34.6
	500	497.5 ± 5.7	99	0.27	79.7
	1000	988.2 ± 15.4	99	0.64	54.9
	1500	1508.0 ± 12.1	100	1.35	23.6
C_{12}EO_8	500	498.1 ± 4.3	100	1.47	20.1
	1000	1006.4 ± 10.7	101	1.45	20.7
	2000	1990.9 ± 15.5	99	0.71	50.9
	3000	3016.7 ± 20.1	101	1.26	26.2
C_{14}EO_6	250	247.5 ± 3.7	99	0.12	90.8
	500	502.4 ± 4.8	100	1.37	22.9
	1000	990.1 ± 10.9	99	0.94	39.1
	1500	1490.7 ± 14.2	99	1.12	31.2
C_{14}EO_8	750	741.3 ± 10.1	99	0.81	45.6
	1500	1519.7 ± 22.3	101	0.47	66.1
	3000	2973.1 ± 40.2	99	0.88	41.8
	4500	4544.9 ± 73.5	101	1.22	27.5
C_{16}EO_6	250	247.9 ± 3.0	99	1.03	35.2
	500	496.5 ± 5.2	99	1.50	19.5
	1000	992.5 ± 12.4	99	1.22	27.7
	1500	1511.1 ± 19.1	101	1.04	34.6
C_{16}EO_8	1000	1011.5 ± 13.8	101	1.46	20.4
	2000	1980.7 ± 25.5	99	1.18	29.3
	4000	4047.6 ± 51.3	102	1.39	22.4
	6000	5920.4 ± 90.1	99	1.69	15.3
C_{18}EO_6	250	250.9 ± 2.4	100	0.94	39.1
	500	503.7 ± 5.0	101	1.14	30.6
	1000	1010.9 ± 13.7	101	1.21	28.2
	1500	1485.0 ± 18.1	99	0.71	50.9
C_{18}EO_8	1250	1237.4 ± 16.7	99	1.77	13.8
	2500	2559.3 ± 40.3	102	1.08	33.0
	5000	4920.2 ± 90.1	98	2.00	10.2
	7500	7590.2 ± 120.7	101	1.33	24.2

A los datos obtenidos se les aplicó el test de comparación de una media experimental con un valor conocido. Los valores de t_{calc} fueron en todos los casos inferiores a los valores de t_{tab} , resultando en la aceptación de la hipótesis nula (no hay diferencia significativas entre las concentraciones encontradas y las añadidas), demostrándose con esto que el método desarrollado produce resultados veraces.

2 - APLICACIÓN DE LA METODOLOGÍA DESARROLLADA

En este apartado se expone la aplicación de la metodología analítica desarrollada para la determinación de ocho AEO en muestras de suelo.

La aplicación consistió en la verificación de la presencia o ausencia de estos analitos en 15 muestras de suelo colectadas en distintos puntos de la Vega de Granada.

Las muestras fueron las mismas que las estudiadas en el **apartado 3.1 del Capítulo 4**.

El resultado del estudio fue que no se detectó ninguno de los ocho alcoholes etoxilados estudiados en las muestras analizadas, bien porque no se encontraban presentes en las mismas o porque su concentración estaba por debajo de los límites de detección del método analítico empleado. Los espectros de masas obtenidos sí mostraron la presencia de otros compuestos como ácidos grasos saturados.

Debido al gran número de picos en los cromatogramas de las muestras se decidió dopar los extractos finales de las mismas con una disolución de acetato de etilo conteniendo los ocho patrones de alcoholes etoxilados, verificando que los tiempos de retención de estos picos no coincidían con los tiempos de retención de los picos correspondientes a los compuestos objeto de estudio.

CONCLUSIONES

La investigación desarrollada a lo largo de esta Memoria ha conducido a las siguientes conclusiones:

- ⇒ Se ha llevado a cabo la síntesis y caracterización de seis ácidos sulfofenilcarboxílicos. Las técnicas analíticas empleadas para la caracterización de estos compuestos han sido espectroscopía IR, Resonancia Magnética Nuclear de ^1H y ^{13}C y espectrometría de masas.
- ⇒ Se ha desarrollado y validado una nueva metodología analítica mediante el empleo de cromatografía líquida con detección fluorescente para la separación y determinación de seis ácidos sulfofenilcarboxílicos en muestras de agua.

El método propuesto conlleva una etapa previa de reducción de volumen de muestra en rotavapor, seguida de una etapa de limpieza y preconcentración de los analitos mediante extracción en fase sólida. Finalmente, los compuestos objeto de estudio son separados y determinados mediante cromatografía líquida con detección fluorescente. Los límites de detección obtenidos, entre 0.2 y 0.4 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, son suficientemente bajos como para poder emplear este método para la detección y determinación de estos compuestos en muestras acuosas ambientales.

- ⇒ Se ha desarrollado y validado una nueva metodología analítica mediante el empleo de electroforesis capilar con detección con Diodos Array para la separación y determinación de seis ácidos sulfofenilcarboxílicos en muestras de agua.

El método propuesto conlleva una etapa previa de reducción de volumen de muestra en rotavapor, seguida de una etapa de limpieza y preconcentración de los analitos mediante extracción en fase sólida. Finalmente, los compuestos objeto de estudio son separados y determinados mediante electroforesis capilar con detección con Diodos Array. Para disminuir los límites de detección del método se empleó Stacking en modo normal como procedimiento de preconcentración on-line. Los límites de detección obtenidos, entre 1.0 y 2.0 ng·mL⁻¹, son suficientemente bajos como para poder emplear este método para la detección y determinación de estos compuestos en muestras ambientales.

⇒ Se ha desarrollado y validado una nueva metodología analítica mediante el empleo de cromatografía líquida con detección fluorescente para la separación y determinación de alquifenoles y alquifenoles etoxilados en muestras de suelo.

El método propuesto consta de una primera etapa de tratamiento de muestra mediante extracción con disolventes presurizados. El extracto obtenido se somete a una etapa de preconcentración y limpieza empleando la extracción en fase sólida. Finalmente, los compuestos objeto de estudio son separados y determinados mediante cromatografía líquida con detección fluorescente. Los límites de detección obtenidos, entre 5.9 y 60.1 ng·g⁻¹, son suficientemente bajos como para poder emplear este método para la detección y determinación de estos compuestos en muestras ambientales.

⇒ Se ha desarrollado y validado una nueva metodología analítica mediante el empleo de cromatografía de gases acoplada con

espectrometría de masas para la separación y determinación de alquifenoles y alquifenoles etoxilados en muestras de suelo.

El método propuesto consta de una primera etapa de tratamiento de muestra mediante extracción con disolventes presurizados. El extracto obtenido se somete a una etapa de preconcentración y limpieza empleando la extracción en fase sólida. Posteriormente tiene lugar una etapa de derivatización en la que se emplea BSTFA como agente derivatizante. Finalmente, los compuestos derivatizados son separados y determinados mediante cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas. Los límites de detección obtenidos, entre 0.9 y 37.8 ng·g⁻¹, son suficientemente bajos como para poder emplear este método para la detección y determinación de estos compuestos en muestras ambientales.

⇒ Se ha desarrollado y validado una nueva metodología analítica mediante el empleo de cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas para la separación y determinación de alcoholes etoxilados lineales en muestras de suelo.

El método propuesto consta de una primera etapa de tratamiento de muestra mediante extracción con disolventes presurizados. El extracto obtenido se somete a una etapa de preconcentración y limpieza empleando la extracción en fase sólida. Posteriormente tiene lugar una etapa de derivatización en la que se emplea BSTFA como agente derivatizante. Finalmente, los compuestos derivatizados son separados y determinados mediante cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas. Los límites de detección obtenidos, entre 15.8 y 117.3 ng·g⁻¹, son suficientemente

bajos como para poder emplear este método para la detección y determinación de estos compuestos en muestras ambientales.

- ⇒ Se ha llevado a cabo un estudio de campo consistente en el seguimiento de la biodegradación del tensioactivo LAS mediante el análisis de ácidos sulfofenilcarboxílicos en el agua de riego lixiviada.

El aporte de LAS se realizó mediante irrigación forzada, siendo las muestras de agua recolectadas con la ayuda de hidrocaptos a distintas profundidades. Previamente se realizó un estudio de adsorción de ácidos sulfofenilcarboxílicos en columna que permitió verificar que estos compuestos no se adsorben en el suelo, eligiendo por este motivo como muestra de análisis el agua lixiviada.

Del análisis de los resultados obtenidos puede concluirse que el LAS es biodegradado durante su lixiviación ya que se han encontrado ácidos sulfofenilcarboxílicos en las muestras de agua analizadas, y que el tiempo de vida de estos compuestos es reducido, por tanto no tendrían el problema de acumularse en el medio ambiente.

- ⇒ Se ha llevado a cabo una experiencia de campo consistente en la evaluación del comportamiento de los tensioactivos alquilfenoles etoxilados en suelo agrícola.

El aporte de alquilfenoles etoxilados se realizó mediante irrigación forzada, siendo las muestras de suelo recolectadas a profundidades comprendidas entre 0 y 60 cm.

Del estudio puede concluirse que:

- √ Se produce la lixiviación de estos compuestos puesto que han sido detectados incluso a 60 cm de profundidad.
 - √ No existe evidencia de la degradación mediante hidrólisis del enlace éter-fenólico ya que no se ha detectado 4-t-OP en ninguna de las muestras colectadas.
 - √ El mecanismo de degradación que parece ajustarse más a los resultados obtenidos es el propuesto por Schröder⁷² según el cual la cadena etoxilada se acorta un mol de etilenglicol en cada paso, permaneciendo unida al resto hidrofóbico.
 - √ Dada la persistencia de los compuestos 4-t-OPEO de 1 y 2 unidades etoxiladas, la desaparición de estos con el transcurso del tiempo se debería a su lixiviación, pudiendo alcanzar profundidades significativas y, consecuentemente, dar lugar a la contaminación de acuíferos y aguas subterráneas.
- ⇒ Se ha estudiado la presencia de los tensioactivos alquilfenoles etoxilados y alcoholes etoxilados en muestras de suelo colectadas en distintos puntos de la Vega de Granada. Los resultados obtenidos fueron que estos tensioactivos no se encuentran presentes en las muestras de suelo colectadas o bien que las concentraciones a las que se encuentran se sitúan por debajo de los límites de detección de los métodos analíticos empleados para su análisis.

ARTÍCULOS

Inmaculada Jiménez-Díaz
Oscar Ballesteros
José Luis Vilchez
Alberto Navalón

Department of Analytical
Chemistry,
Faculty of Sciences,
University of Granada,
Granada, Spain

Received February 14, 2007
Revised July 18, 2007
Accepted July 21, 2007

Research Article

Determination of sulfophenyl carboxylic acids in agricultural groundwater samples by CE with ultraviolet absorption detection

An analytical method for the determination of six sulfophenyl carboxylic acids, namely (*p*-sulfophenyl)acetic, 2-(*p*-sulfophenyl)propionic, 2-(*p*-sulfophenyl)butyric, 3-(*p*-sulfophenyl)butyric, 4-(*p*-sulfophenyl)butyric, and 5-(*p*-sulfophenyl)valerianic acid, in agricultural irrigation water samples was developed. It involves an SPE procedure, an on-line pre-concentration normal stacking mode and subsequent separation and determination using CE with UV detection (CE-UV). *p*-Sulfobenzoic acid was used as internal standard. The compounds were separated with an uncoated capillary and a 25 mM ammonium acetate/ acetic acid buffer solution (pH 5.5) with 2-propanol (30% v/v) and 0.75 mM CTAB. Analyses were run at –25 kV, 25°C, and 100 s of hydrodynamic injection with UV detection at 225 nm. Quantification limits found ranged between 4 and 6 ng/mL. The proposed method was validated using a recovery assay. It was satisfactorily used for the determination of these compounds in groundwater samples to track down the biodegradation of linear alkylbenzene sulfonates in an agricultural soil from the fertile plain of Granada (Spain).

Keywords:

CE / SPE / Stacking / Sulfophenyl carboxylic acids / Water analysis

DOI 10.1002/elps.200700403

1 Introduction

Although in terms of surfactant tonnage used worldwide, soap is still used more than synthetic detergents, the great variety of end products in which the latter are involved shows just how spectacular their process development has been.

Out of the 20 million tons (mT) of surfactant consumed in the world in 2000, just over 50% (10.5 mT) corresponds to soap, the rest (9.5 mT) being synthetic detergents [1] among which linear alkylbenzene sulfonates (LAS) account for sample 3.3 mT (34.7%).

LAS are always present in urban wastewater and can be found in many different environmental compartments [2, 3]. The majority of this wastewater is treated *via* domestic treatment plants where LAS's biodegradation may occur, but they can be introduced as pollutants in

natural ecosystems through the direct application of untreated wastewater as irrigation water and through the use of sewage sludge as a fertilizer on agricultural soils [4]. Moreover, LAS may enter the soil compartment through the use of pesticides, detergents incorporated to pesticide formulations as emulsifiers, dispersing, and spreading agents [5].

Knowledge about the microbial degradation pathway of LAS (Fig. 1) is still somewhat incomplete [6–8] but the most widely accepted mechanism consists of the ω -oxidation of the terminal carbon atom of the alkyl chain, followed by successive β -oxidations.

As a result of this process, sulfophenyl carboxylic acids (SPCs) are formed. They constitute the most abundant degradation intermediates of LAS. Chemical structures of the studied SPCs are shown in Fig. 2.

Desulfonation may produce hydroxyphenyl carboxylic acids or phenyl carboxylic acids. At the end of the biodegradation process, the molecules are mineralized by bacteria [9].

Swisher's distance principle states that biodegradation rates of LAS increase with increasing distance between the sulfonate group and the far end of the alkyl chain, thus 2-phenyl C₁₂ LAS degrades faster than 6-phenyl C₁₂ LAS and C₁₃ LAS degrades faster than C₁₀ LAS [10].

Correspondence: Professor Alberto Navalón, Research Group of Analytical Chemistry and Life Sciences, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, Campus of Fuentenueva, E-18071 Granada, Spain
E-mail: anavalon@ugr.es
Fax: +34-958-243-328

Abbreviations: LAS, linear alkylbenzene sulfonates; NSM, normal stacking mode; SPCs, sulfophenyl carboxylic acid

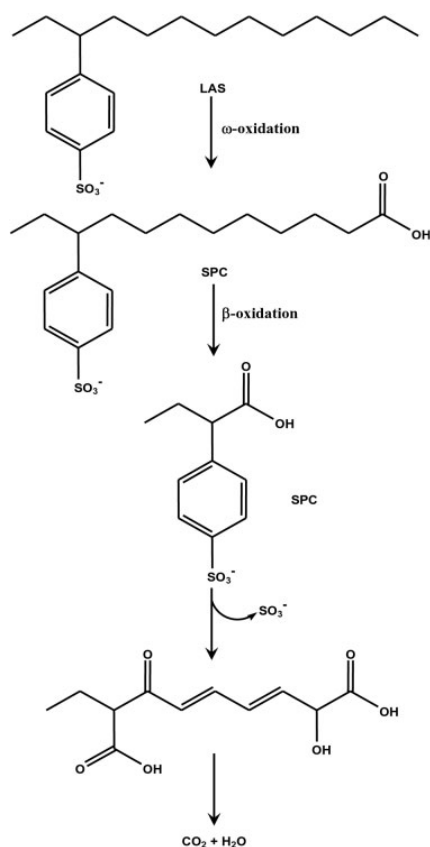


Figure 1. Scheme of the LAS biodegradation process.

The behavior of LAS and SPCs depends largely on their molecular properties and on the medium into which the effluent containing them is discharged. As a result of the surfactant nature of LAS, transport mechanisms involved in the dispersion of LAS to accumulate first on the surface of the aqueous medium [11, 12], make them showing a notable capacity for adsorption by sediments and suspended solids, both in continental ecosystems and in the marine medium. SPCs are not surfactant in character, being more polar compounds, and must show lower affinities with particulate matter. Therefore, differences in the behavior of LAS and SPCs (transport, distribution, degradation) come from differences in their physicochemical properties.

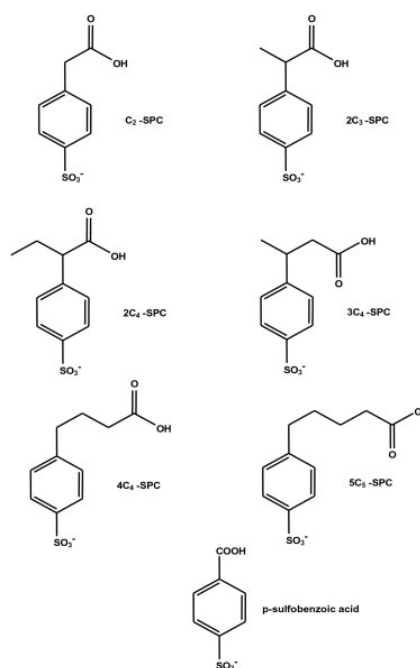


Figure 2. Chemical structure of the studied SPCs and *p*-sulfobenzoic acid (internal standard).

Determination of the levels of the main degradation intermediates of LAS is a very relevant question. LAS's toxicity towards organisms has been proven [13, 14] and abundant release in an aquatic environment induces severe ecological problems. LAS biodegradability nevertheless decreases its toxic effects. Although the toxicity of SPCs is not known with any certainty, it was found that SPCs give LC_{50} values that are 120–240% higher than that of LAS [15].

LAS and SPCs characterization and quantification using GC-MS after a derivatization step (in order to obtain their corresponding ester derivatives) has been satisfactory [16–21] although tedious as consequence of the previous derivatization procedure.

HPLC is also an effective technique for the analysis of SPCs having had a previous step of preconcentration by a SPE procedure to improve the detection and quantification limits [22–24].

CE has proven to be a very powerful tool for characterization of inorganic and organic compounds since its introduction by Jorgenson and Lukacs [25] in the early 1980's. It is a fast technique involving short analysis times and high

separation efficiency. CE has proved to be a good alternative to HPLC by its less costly and requires only modest quantities of sample. The sensitivity of CE with UV–Vis absorbance detection is, however, relatively poor compared with that in HPLC. It is hindered by the short optical path length defined by the capillary diameter. To improve the LODs several on-line preconcentration strategies have been developed [26, 27]. One of these procedures is called normal stacking mode (NSM) and consists in the injection of a high amount of sample with lower conductivity than that of the separation buffer.

Owing to their polar nature and ionic character, SPCs are suitable for their determination by CE. Kanz *et al.* [28] developed a CE-UV method for determination of the enantiomers of 2-(*p*-sulphophenyl)butyric acid and 3-(*p*-sulphophenyl)butyric acid. It involves a SPE with graphitized carbon black (Carbopack B) and the transformation of these enantiomers within activated sewage sludge from a municipal wastewater treatment plant. LOD was 1 ng/mL for each enantiomer. Riu and Barceló [29] proposed a capillary electrophoretic-mass spectrometric (CE-MS) method for the determination of LAS and SPCs (from C₂ to C₁₃) in sewage-treatment plants using a SPE step with Isolute ENV+ cartridges. No calibration graphs were carried out for SPCs therefore they were only identified. The analysis time was about 70 min.

Here, a CE-UV method for the simultaneous determination of six sulphophenyl carboxylic acids, namely, (*p*-sulphophenyl)acetic, 2-(*p*-sulphophenyl)propionic, 2-(*p*-sulphophenyl)butyric, 3-(*p*-sulphophenyl)butyric, 4-(*p*-sulphophenyl)butyric, and 5-(*p*-sulphophenyl)valeric acid (three of them isomers), has been developed. It involves a SPE step and an on-line preconcentration strategy (NSM). It has been successfully applied to their determination in groundwater samples derived from the biodegradation of LAS in local agricultural soil.

2 Materials and methods

2.1 Chemicals and reagents

All reagents were of analytical grade, unless stated otherwise. Water (18.2 MΩ/cm) was purified by means of a Milli-Q plus system (Millipore, Bedford, MA, USA).

Commercial LAS were kindly supplied by Petroquímica Española S.A. (Madrid, Spain) as aqueous sodium salt solutions with an LAS content of 44.05% w/w. The average molecular mass of the Na-LAS was 342.2 g/mol and the distribution of the linear alkyl chain homologs was C₁₀, 14.14%; C₁₁, 32.72%; C₁₂, 29.74%; and C₁₃, 23.40%. SPC standards were also kindly supplied by Petroquímica Española S.A. and *p*-sulphobenzoic acid, used as internal standard, was purchased from Sigma–Aldrich (Madrid, Spain).

Stock solutions (100 mg/L) of each SPC and *p*-sulphobenzoic acid were prepared in deionized water and stored at 4°C in the dark. These solutions were stable for over

3 months. Working standards were prepared just before use, by appropriate dilution with deionized water.

ACN (HPLC-grade), ammonium acetate, acetic acid, citric acid, dichloromethane (HPLC-grade), ethylene glycol, 2-propanol (HPLC-grade), sodium citrate, sodium dihydrogen phosphate, perchloric acid, sodium hydroxide, and *o*-phosphoric acid were supplied by Panreac (Barcelona, Spain). Methanol (HPLC-grade) and THF (HPLC-grade) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). CTAB was supplied by Fluka (Buchs, Switzerland).

Solvents and aqueous solutions used were filtered through 0.45 μm nylon membranes (Millipore).

Isolute SAX (500 mg/3 mL) and Isolute ENV+ (200 mg/3 mL) SPE adsorbent cartridges were purchased from Isolute Sorbent Technologies (Mid Glamorgan, UK).

2.2 Apparatus and software

CE-UV analyses were performed in an Agilent^{3D} CE instrument (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with an UV-DAD, a thermostated column cartridge, a high-voltage built-in power supply, and an autosampler. ChemStation version A.0901 software was used for instrument control and for data acquisition and analysis. Separations were carried out in fused-silica capillaries (58.5 cm × 75 μm id) with a capillary effective length of 50 cm.

All pH measurements were made with a Crison (Crison Instruments SA, Barcelona, Spain) combined glass-saturated calomel electrode using an earlier calibrated Crison 2000 digital pH-meter.

A Büchi R-200 rotavapor (Flawil, Switzerland) equipped with a B-490 heating bath and a vacuum pump unit and a Hettich Universal 32 centrifuge (Tuttlingen, Germany) were also used.

SPE was carried out on a Supelco (Madrid, Spain) vacuum manifold for 12 columns connected to a Supelco vacuum tank and to a vacuum pump.

Statgraphics [30] software package was used for statistical analysis of the data and for regression analysis (linear model).

2.3 Sampling and pretreatment of the samples

A plot of 36 m² located in the fertile plain of Granada (commonly denominated “Vega de Granada”) was chosen to carry out the study. In this plot two series of three hydro-captors were placed at two different depths (25 and 50 cm, respectively). The first day of the study the plot was irrigated with 4799.2 L of water containing 449.5 g of the commercial LAS (final concentration of LAS was 41.2 mg/L). The average lixiviation time was estimated in 4 h. Subsequent irrigations were made with the same quantity of water without LAS on the sixth, the thirteenth, the twentieth, and the twenty-seventh day and the samplings were carried out on the sec-

ond, the seventh, the fourteenth, the twenty-third, and the thirtieth day.

The water samples were collected using the above mentioned hydro-captors and transferred to glass bottles (previously cleaned with chromic acid and washed with deionized water). A small volume (1 mL per 100 mL of sample) of formaldehyde was added to the samples as bactericide agent and the usual precautions were taken to avoid contamination. Samples were centrifuged at 4000 rpm (2360 × *g*) for 10 min and filtered through 0.20 μm regenerated cellulose membrane filters (Sartorius, Barcelona, Spain). Then, 100 mL of each water sample were concentrated in a rotary vacuum evaporator (rotavapor) up to 8 mL, approximately, placed into 10 mL calibrated flasks and 0.2 mL of the internal standard solution (100 mg/L) was added. Finally, the samples were risen up to 10 mL with deionized water acidified to pH 1.5 with HClO₄. Analyses were carried out according to the procedure described in Section 2.4.

2.4 Basic procedures

2.4.1 SPE procedure

Prior the extraction, Isolute ENV+ SPE cartridges were activated with 6 mL of methanol and 6 mL of 50 mM phosphate buffer solution (pH 1.5). Subsequently, the samples (10 mL) were passed through the cartridges at a flow rate of 2–3 mL/min and then dried under vacuum for 20 min. Finally, elution was performed with 3 mL of methanol/dichloromethane mixture 9:1 v/v. The eluates were evaporated to dryness at room-temperature under a stream of nitrogen. One milliliter of deionized water was added in order to resuspend the residue and the resulting extract, after being filtered, was injected into the CE system.

2.4.2 Electrophoretic procedure

CE separations were carried out in a fused-silica capillary (75 μm id, total length 58.5 cm, a detection window was created at 50 cm from the capillary inlet by removing the polyimide coating). The new capillary was preconditioned by rinsing with 1 M NaOH for 15 min at 40°C, followed by rinsing 10 min with deionized water and 15 min with the buffer solution. For the following analyses the capillary was rinsed with 0.1 M NaOH for 5 min at room temperature, followed by a 5 min flush with deionized water to assure good repeatability. The capillary was equilibrated with the running buffer (25 mM ammonium acetate/acetic acid at pH 5.5 with 2-propanol (30%; v/v) and 0.75 mM CTAB) for 15 min each sample injection. Samples were injected hydrodynamically in the cathodic end of the capillary with a low-pressure mode (50 mbar, 0.725 psi) for 100 s. Electrophoretic separations were performed at –25 kV for 15 min, resulting in a current of about –8 μA. The temperature of the capillary was constant at 25°C.

Prior to injection, the buffer solution and the samples were filtered through 0.20 μm regenerated cellulose membrane filters (Sartorius). The running buffer was changed after three runs. UV detection was carried out at 225 nm.

3 Results and discussion

3.1 Effect of experimental variables

The effect of experimental variables (pH, type and concentration of buffer, type and percentage of organic solvent, and concentration of the electrosmotic flow (EOF) modifier) was studied on a standard mixture of SPCs. Initial conditions were: 50 mM ammonium acetate/acetic acid buffer solution with 30% v/v of 2-propanol, at 25°C and –20 kV. It was used reversed polarity because at pH values above 5, analytes have two negative charges which would be heavily repelled by the cathode.

The influence of buffer solution pH was tested in the interval 4.5–6.5, in steps of 0.5 (Fig. 3). There it is observed that at pH values higher than 5.5, analysis times are shorter, but the resolution for the studied compounds is worse, specifically for the *p*-(sulfophenyl)butyric acids (2C₄, 3C₄, and 4C₄-SPC). At pH values lower than 5.5 resolutions are better, but analysis time is longer. This is a consequence of an increase in the ionization of SPCs when pH increases. Therefore, the selected working pH value was 5.5, a compromise value between the resolution of all the compounds and the analysis time.

Different buffer solutions were assayed: ammonium acetate/acetic acid, sodium citrate/citric acid, and sodium dihydrogen phosphate/*o*-phosphoric acid. The acetate buffer solution was selected for subsequent experiments because it gives the best compromise between the resolution of the studied compounds and analysis time.

Next, the acetate buffer concentration was investigated. When the concentration of buffer solution was increased in the range 25–150 mM, it led to longer analysis times and worse resolution for peaks 3, 4, and 5 (Fig. 3). We decided that 25 mM concentration buffer solution was the best selection.

Besides the buffer characteristics (type, concentration, and pH), EOF is also controlled by adding solvents or other substances. Solvents addition increases viscosity reducing the dielectric constant of the electrolyte leading to a migration time increase, affecting the resolution. Different solvents (ACN, methanol, THF, ethylene glycol, and 2-propanol) were tested at a percentage of 30% v/v. ACN, THF, and 2-propanol gave good results and concentrations between 5 and 35% in steps of 5% were further explored. We chose 30% v/v of 2-propanol to get peaks with better symmetry and shorter analysis time.

Surfactants are frequently added to the buffer to try to optimize both the EOF and the separation process. CTAB is one of the most widely used surfactants when reversed polarity is applied. It acts adsorbing onto the capillary surface through electrostatic and/or hydrophobic interactions, thus

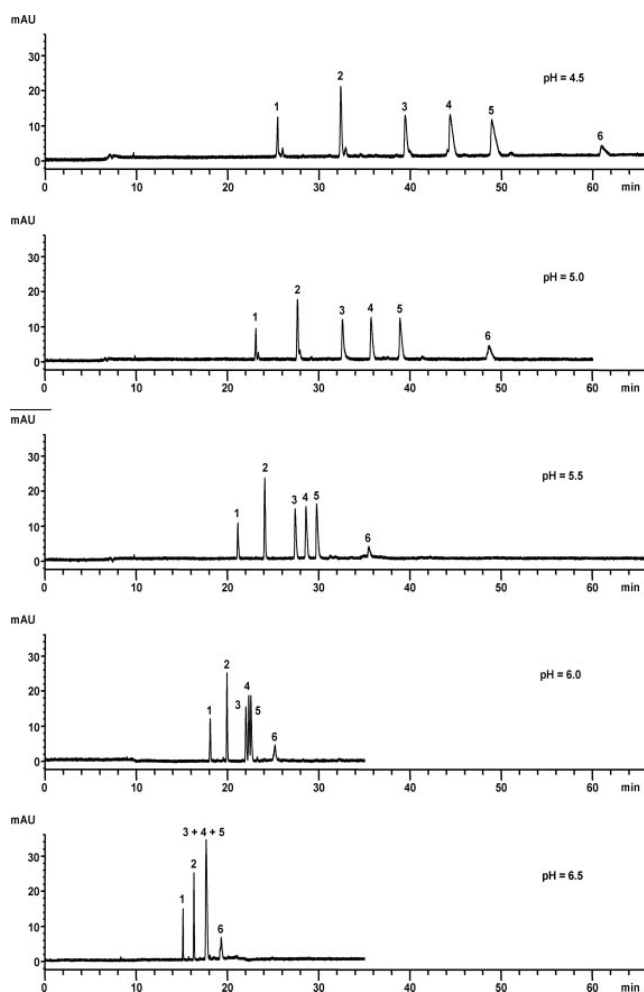


Figure 3. Influence of the pH on the resolution of the analytes. Separation conditions: 50 mM ammonium acetate/acetic acid buffer solution with 30% v/v 2-propanol; voltage, -20 kV; capillary temperature, 25°C ; detection wavelength, 225 nm; injection, 50 mbar for 10 s; capillary effective length, 50 cm. Peak identifications: (1) (*p*-sulphophenyl)acetic acid (C_2); (2) 2-(*p*-sulphophenyl)propionic acid (2C_3); (3) 2-(*p*-sulphophenyl)butyric acid (2C_4); (4) 3-(*p*-sulphophenyl)butyric acid (3C_4); (5) 4-(*p*-sulphophenyl)butyric acid (4C_4); (6) 5-(*p*-sulphophenyl)valerianic acid (5C_5).

allowing the direction of the EOF to change. Its addition leads to a decrease in analysis time and improves reproducibility. The CTAB concentration was tested between 0.5 and 5.0 mM. At high percentage of 2-propanol in the buffer, CTAB does not form micelles although it was used above its CMC. The chosen concentration value of 1.0 mM is a compromise between the resolution of all compounds and the analysis time (Fig. 4).

3.2 Effect of instrumental parameters

The applied voltage was varied from -15 to -30 kV. The voltage leading to shorter analysis time and good reproducibility was -25 kV. The Joule heat generated inside the capillary was well dissipated by the equipment at this voltage.

Further, the effect of the temperature was studied. The temperature selected to get shorter analysis times

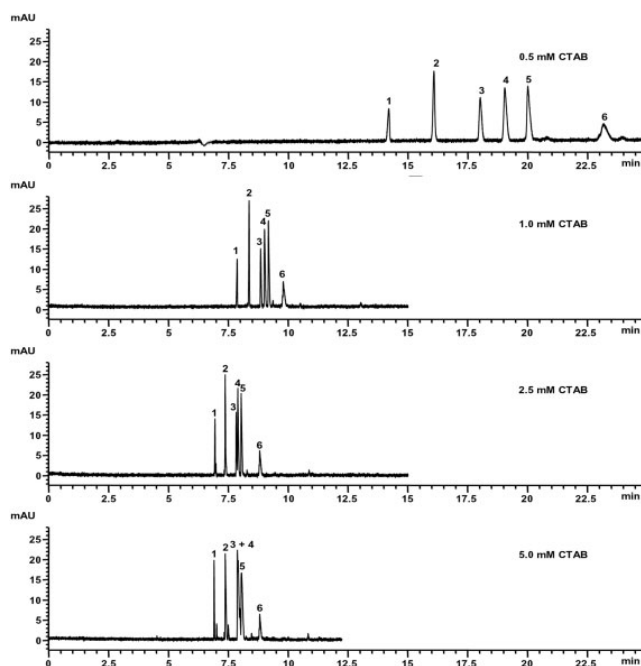


Figure 4. Influence of CTAB concentration on the resolution of the analytes. Separation conditions: 25 mM ammonium acetate/acetic acid buffer solution (pH 5.5) with 30% v/v 2-propanol; voltage, -20 kV; capillary temperature, 25°C ; detection wavelength, 225 nm; injection, 50 mbar for 10 s; and capillary effective length, 50 cm. Peak identifications are as in Fig. 3.

and dissipate properly the Joule heat generated inside the capillary was 25°C .

3.3 Preconcentration procedures

3.3.1 SPE

SPE procedure to extract analytes from the samples previously evaporated was optimized by adjusting those parameters that impact analyte adsorption and desorption, *i.e.*, nature of stationary phase and eluent.

Two commercially available SPE adsorbent cartridges (Isolute SAX and Isolute ENV+) were tested for extraction of analytes from aqueous samples. The Isolute SAX cartridges were previously activated with 2 mL of *n*-hexane and 10 mL of methanol. Subsequently, the samples were passed through the cartridges at a flow rate of 2–3 mL/min. Two different clean-ups were tested: water (5 mL) and water with 2% v/v of concentrated acetic acid (5 mL). The best recoveries were obtained for the clean-up step performed with acidified water. Due to the high polarity of SPCs, elution was performed with hydrochloric acid (37% w/w) in methanol. Different concentrations were studied: 0, 2, 4, 6, 8, and 10 M, obtaining the best recov-

eries with hydrochloric acid 10 M in methanol, especially for the short-chain compounds. Different elution volumes were tested choosing finally 2 mL.

The Isolute ENV+ cartridges were previously activated with 6 mL of methanol and 6 mL of deionized water with acetic acid at pH 3.0. The samples were acidified with acetic acid too (pH 3.0). It was observed that the recoveries were low if a buffer was not used for the conditioning of the cartridges. Then, the acidified water (pH 3.0) in the conditioning step was replaced by a 50 mM phosphate buffer solution. Different pH values of the buffer solution were studied (1.5, 2.0, 2.5, 3.0, and 3.5) checking that the recoveries increased when the pH of the buffer decreased. Thus, the pH chosen was 1.5. The pH of the samples was adjusted with different acids (HCl, HClO_4 , H_3PO_4 , and HCOOH) to different values (1.5, 2.0, 2.5, 3.0, and 3.5) checking that the best recoveries were obtained when the samples were acidified with HClO_4 to pH 1.5. The role of eluent nature was also investigated using the following solutions: 0.1% v/v formic acid in methanol, 5% v/v acetic acid in ethyl acetate, 0.2% v/v TFA in acetone, and methanol/dichloromethane 9:1 v/v. The best recoveries were obtained with the methanol/dichloromethane mixture so this was the eluent chosen. Different elution volumes were tested choosing finally 3 mL.

From the results obtained using both types of SPE cartridges, we concluded that the recoveries achieved with the Isolute ENV+ cartridges were, in its entirety, better for the assayed SPCs (Table 1). Moreover, the experimental conditions for the SPE procedure using these cartridges are less drastic than for the procedure using the Isolute SAX cartridges.

Table 1. Recoveries obtained using Isolute SAX and Isolute ENV+ SPE cartridges

Compound	Isolute SAX	Isolute ENV+
C ₂	90	62
2C ₃	75	75
2C ₄	45	93
3C ₄	75	82
4C ₄	80	76
5C ₅	85	89

Isolute SAX conditions: conditioning with 2 mL of *n*-hexane followed by 10 mL of MeOH; loading with 10 mL of sample acidified up to pH 1.5 with HClO₄; eluting with 2 mL of 10 M HCl methanolic solution.

Isolute ENV+ conditions: conditioning with 5 mL of MeOH followed by 5 mL of 50 mM phosphate buffer (pH 1.5); loading with 10 mL of sample containing 1 mL of 500 mM phosphate buffer (pH 1.5); and eluting with 3 mL of the mixture MeOH/CH₂Cl₂ (9:1 v/v).

3.3.2 On-line preconcentration

To improve the detection and quantification limits of the electrophoretic method an on-line preconcentration step was tested. If samples are injected hydrodynamically in the cathodic end, NSM is appropriate. In NSM, focusing happens at the interface between the low conductivity matrix and the more conductive

BGE due to the abrupt change in the local electric field, and as consequence, the electrophoretic mobility of the analytes.

Three injection times, 60, 100, and 150 s, were tested in order to obtain as much sensitivity as possible, with the same optimized conditions obtained previously in Sections 3.1 and 3.2. It was observed that times higher than 100 s yielded in peak overlapping and, at the same time, higher analysis times due to the large amount of sample injected. Therefore, the time chosen was 100 s. It was necessary however to introduce a little change in the optimized conditions because peaks appeared overlapped with this high injection time. The easiest choice was to change the concentration of the EOF modifier. Two different values were tested, 0.75 and 0.50 mM, choosing 0.75 mM as the best compromise between the resolution of all compounds and the analysis time. Finally, two different values of the pressure injection were tested, 25 and 50 mbar, selecting 50 mbar because it allowed to obtain greater sensitivity.

A representative electropherogram of a standard mixture of studied SPCs, obtained under optimized conditions, is shown in Fig. 5.

3.4 Figures of merit

Calibration graphs for samples treated according to Section 2.4 were built by injecting different standard solutions at growing concentrations. *p*-Sulfobenzoic acid was used as internal standard. Calibration curves were constructed using analyte/internal standard peak area ratio *versus* concentration of analyte. Linearity of the calibration graphs was tested according to the Analytical Methods Committee [31]; the *lack-of-fit* test was applied to two replicates and three injections of each standard. The LOD and quantification were calculated according to the IUPAC criterion [32]. The analytical and statistical parameters for each SPC studied are summarized in Table 2.

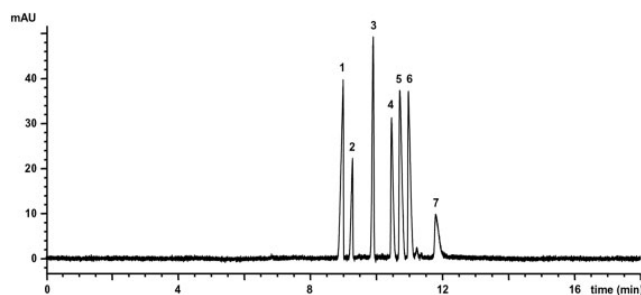


Figure 5. Representative electropherogram of a standard mixture of the studied SPCs (30 ng/mL of each compound) and internal standard (20 ng/mL) under optimized conditions. Separation conditions: running buffer, 25 mM ammonium acetate/acetic acid (pH 5.5) with 30% v/v 2-propanol and 0.75 mM CTAB; voltage, –25 kV; capillary temperature, 25°C; detection wavelength, 225 nm; injection, 50 mbar for 100 s; capillary effective length, 50 cm. Peak identifications: (1) *p*-sulfobenzoic acid (IS); (2) (*p*-sulfophenyl)acetic acid (C₂); (3) 2-(*p*-sulfophenyl)propionic acid (2C₃); (4) 2-(*p*-sulfophenyl)butyric acid (2C₄); (5) 3-(*p*-sulfophenyl)butyric acid (3C₄); (6) 4-(*p*-sulfophenyl)butyric acid (4C₄); (7) 5-(*p*-sulfophenyl)valeric acid (5C₅).

Table 2. Analytical and statistical parameters

Parameter	C ₂	2C ₃	2C ₄	3C ₄	4C ₄	5C ₅
Intercept (<i>a</i>)	0.0122	-0.0013	0.0089	0.0026	0.0060	-0.0036
Intercept SD (<i>S_a</i>)	0.0017	0.0033	0.0035	0.0068	0.0039	0.0037
Slope (<i>b</i>) (mL/ng)	0.0043	0.0087	0.0068	0.0101	0.0097	0.0052
Slope SD (<i>S_b</i>)	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Regression SD (<i>S_{y/x}</i>)	0.0066	0.0130	0.0136	0.0169	0.0153	0.0116
Lack-of-fit test (<i>p</i> -value)	25.3	28.7	36.1	45.8	23.5	38.0
Correlation coefficient (<i>r</i> ²) (%)	99.96	99.96	99.92	99.87	99.96	99.91
Linear dynamic range (ng/mL)	4–200	4–200	6–200	5–200	5–200	6–200
Detection limit (ng/mL)	1	1	2	1	1	2
Quantification limit (ng/mL)	4	4	6	5	5	6

SPE: Isolute ENV+ cartridges, experimental conditions were as in Table 1. Electrophoretic conditions were as in Fig. 5.

In order to determine the intraday and interday repeatability, blank water samples were spiked at three concentration levels (50, 100, and 150 ng/mL) and six analyses were performed in 3 days. Recoveries were achieved by comparing the analytical results for extracted standard samples of water at aforementioned concentrations with unextracted standards prepared at the same concentrations in blank extract representing 100% recovery. The results obtained are summarized in Table 3.

Table 3. Intraday and interday recovery (%) and precision (RSD, %)^{a)}

Compound		Concentration level (ng/mL)		
		50	100	150
C ₂	Day 1	61 (2)	63 (2)	62 (2)
	Day 2	62 (2)	61 (2)	63 (1)
	Day 3	63 (1)	64 (2)	61 (2)
2C ₃	Day 1	75 (1)	72 (2)	74 (2)
	Day 2	73 (2)	75 (2)	77 (2)
	Day 3	76 (1)	74 (2)	76 (2)
2C ₄	Day 1	94 (2)	96 (2)	93 (2)
	Day 2	95 (1)	92 (2)	91 (2)
	Day 3	92 (2)	94 (1)	92 (2)
3C ₄	Day 1	80 (1)	84 (2)	81 (2)
	Day 2	83 (2)	85 (2)	82 (1)
	Day 3	82 (2)	81 (2)	84 (2)
4C ₄	Day 1	78 (2)	74 (2)	75 (2)
	Day 2	75 (1)	76 (2)	74 (2)
	Day 3	77 (2)	78 (1)	77 (2)
5C ₅	Day 1	87 (1)	89 (2)	86 (2)
	Day 2	85 (1)	86 (2)	88 (2)
	Day 3	88 (2)	86 (2)	85 (2)

a) Mean of six determinations. RSD (%), relative standard deviation.

3.5 Validation and application of the method

The method validation was carried out with well water from the aquifer of the "Vega de Granada". This water was free of

Table 4. Results of recovery assays (Student's *t*-test) in well water samples to check the accuracy of the proposed method

Com-pound	Spiked (ng/mL)	Found ^{a)} (ng/mL)	Recovery (%)	<i>t</i>	<i>p</i> (%)
C ₂	10	9.9 ± 0.2	99	1.12	31
	20	20.2 ± 0.3	101	1.46	20
	40	39.8 ± 0.4	99	1.47	20
	80	80.5 ± 1.1	101	1.03	35
2C ₃	160	160.5 ± 2.2	100	0.45	33
	10	10.1 ± 0.1	101	1.17	30
	20	19.9 ± 0.4	100	0.54	62
	40	40.1 ± 0.5	100	0.76	48
2C ₄	80	79.6 ± 0.6	100	1.43	21
	160	161.1 ± 2.9	101	0.97	34
	10	9.9 ± 0.1	99	1.94	11
	20	19.9 ± 0.3	99	1.28	26
3C ₄	40	40.1 ± 0.2	100	0.71	51
	80	79.7 ± 1.9	100	0.34	75
	160	161.4 ± 2.5	101	1.39	22
	10	10.1 ± 0.1	101	0.94	39
4C ₄	20	20.1 ± 0.2	100	0.62	57
	40	40.4 ± 0.4	101	1.99	10
	80	79.4 ± 1.2	99	1.25	27
	160	159.3 ± 1.0	100	1.74	14
5C ₅	10	10.0 ± 0.1	100	1.52	19
	20	20.0 ± 0.4	100	0.32	76
	40	40.1 ± 0.5	100	0.76	48
	80	80.4 ± 0.8	101	1.17	30
5C ₅	160	160.9 ± 1.6	101	1.36	23
	10	10.0 ± 0.1	101	1.03	35
	20	20.1 ± 0.2	100	1.04	34
	40	39.8 ± 0.4	100	1.33	24
5C ₅	80	80.2 ± 0.7	100	0.55	60
	160	158.7 ± 1.9	99	1.69	15

a) Mean value ± SD of six determinations.

LAS, as confirmed by analysis [33]. The usual precautions were taken to avoid contamination. The validation samples were prepared using 100 mL of this water spiked with SPCs

at the same concentration levels as the standards used for calibration and treated as these standards (according to procedure above described). First, in order to evaluate the “matrix effect”, a statistical comparison between the slopes and intercepts obtained from the two calibration graphs was carried out. The results found show that there are no significant statistical differences between the slopes and intercepts. Next, the validation of the method for this water sample was tested using a recovery test (Student's *t*-test) [34]. Well water samples were spiked at different levels: 10, 20, 40, 80, and 160 ng/mL for each SPC. As the *p*-values calculated in all cases are greater than 0.05, the null hypothesis appears to be valid, *i.e.*, recoveries are close to 100%. The results obtained are shown in Table 4.

The proposed method was used for determination of SPCs in groundwater samples (at two different depths) in order to evaluate the biodegradation of LAS in an agricultural soil from the fertile plain of Granada. The program of irrigation and sampling was described in Section 2.3.

Previously, a study about the determination of LAS in the soil of the plot selected was carried out at different

depths (surface, 10, 20, 30, 40, 50, and 60 cm) using the method developed by Nimer *et al.* [35]. The achieved results confirmed that these soil samples were free of LAS.

The obtained electropherogram for a water sample taken at a depth of 25 cm on the seventh day is shown in Fig. 6.

Also, during the biodegradation study, the determination of total LAS in the groundwater samples was made using the method proposed by Del Olmo *et al.* [33].

The results obtained, summarized in Table 5, show that the LAS are biodegraded during their lixiviation process and consequently, levels of different metabolites (studied SPCs) are found in the groundwater samples collected into the hydrocaptors. This fact combined with others studies focused on the determination of LAS in both soil and groundwater (at different depths) [35, 36] could be considered as an experimental demonstration that LAS are practically biodegraded before reaching the saturated zone of the aquifer. Apparently, presumably no contamination by LAS occurs when the agricultural soil is irrigated with wastewater containing LAS.

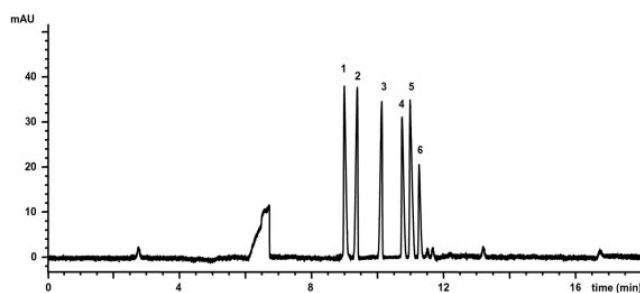


Figure 6. Electropherogram of a groundwater sample taken at a depth of 25 cm on the seventh day of the study. Electrophoretic conditions and peaks identifications are as in Fig. 5.

Table 5. Evolution of the different SPC and LAS levels in groundwater samples after irrigations

Program	Concentration at 25 cm (ng/mL)							Concentration at 50 cm (ng/mL)						
	C ₂	2C ₃	2C ₄	3C ₄	4C ₄	5C ₅	LAS ^{a)}	C ₂	2C ₃	2C ₄	3C ₄	4C ₄	5C ₅	LAS ^{a)}
Day 1	Irrigation with water + LAS							Irrigation with water + LAS						
Day 2	<LOD	<LOD	33	<LOQ	<LOD	<LOD	10.1	<LOD	<LOD	12	9	<LOD	<LOD	7.3
Day 6	Irrigation with water							Irrigation with water						
Day 7	49	18	31	26	6	<LOD	1.4	5	<LOQ	<LOQ	5	23	<LOD	0.6
Day 13	Irrigation with water							Irrigation with water						
Day 14	8	<LOQ	<LOQ	6	14	<LOD	0.1	9	<LOQ	<LOD	9	21	<LOD	0.1
Day 20	Irrigation with water							Irrigation with water						
Day 23	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ	<LOD	0.1	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOQ	5	<LOD	0.1
Day 27	Irrigation with water							Irrigation with water						
Day 30	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ

<LOD: minor than the limit of detection.

<LOQ: minor than the limit of quantification.

a) Total LAS, concentration in µg/mL.

Therefore, the life time of the main biodegradation intermediates of LAS appears to be short and they probably do not accumulate in environment.

In conclusion, the results presented in this paper demonstrate that the determination of sulfophenyl carboxylic acids in groundwater samples using EC-UV can be useful to evaluate the biodegradation of LAS in agricultural soils. The proposed electrophoretic method presents good limits of quantification and repeatability.

This work was supported by the Spanish Minister of Science and Technology (Project No. PPQ2003-07978-CO2-01). Junta de Andalucía in its "Formación de personal Docente e Investigador" program and the Spanish Interministerial Commission of Science and Technology in its "Juan de la Cierva" program. The authors are grateful to Petroquímica Española S.A. for its valuable contribution to this study.

The authors have declared no conflict of interest.

4 References

- [1] Berna, J. L., Bengoechea, C., Moreno, A., in: Spitz, L. (Ed.), *Soaps, Detergents, Oleochemicals, and Personal Care Products (SODEOPEC)*, AOCs Press, Illinois, USA 2004, Chapter 6, pp. 189–211.
- [2] Waters, J., Garrigan, J. T., *Water Res.* 1983, 17, 1549–1562.
- [3] Kikuchi, M., Tokai, A., Yoshida, T., *Water Res.* 1986, 20, 643–650.
- [4] Holt, M. S., Matthus, E., Waters, J., *Water Res.* 1989, 23, 749–759.
- [5] Jensen, J., *Sci. Total Environ.* 1999, 226, 93–111.
- [6] Swisher, R. D., *Surfactant Biodegradation*, 2nd Edn., Marcel Dekker, New York 1987.
- [7] Schöberl, P., in: Kosswig, K., Stache, H. (Eds.), *Die Tenside*, Carl Hanser Verlag, München 1993, pp. 407–464.
- [8] Denger, K., Cook, A. M., *J. Appl. Microbiol.* 1999, 86, 165–168.
- [9] Larson, R. J., *Environ. Sci. Technol.* 1990, 24, 1241–1246.
- [10] Swisher, R. D., *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1963, 40, 648–752.
- [11] González-Mazo, E., Forja, J. M., Gómez-Parra, A., *Environ. Sci. Technol.* 1998, 32, 1636–1641.
- [12] Terzic, S., Hrsak, D., Ahel, M., *Mar. Pollut. Bull.* 1992, 24, 199–204.
- [13] Bressan, M., Brunetti, R., Casellato, S., Fava, G. C. et al., *Tenside Deterg.* 1989, 26, 148–158.
- [14] Argese, E., Marcomini, A., Miana, P., Bettiol, C., Perrin, G., *Environ. Toxicol. Chem.* 1994, 13, 737–742.
- [15] Kimerle, R. A., Swisher, R. D., *Water Res.* 1977, 11, 31–37.
- [16] Tabor, C. F., Barber II, L. B., *Environ. Sci. Technol.* 1996, 30, 161–171.
- [17] Trehy, M. L., Gledhill, W. E., Orth, R. G., *Anal. Chem.* 1990, 62, 2581–2586.
- [18] Field, J. A., Miller, D. J., Field, T. M., Hawthorne, S. B., Giger, W., *Anal. Chem.* 1992, 64, 3161–3167.
- [19] McEvoy, J., Giger, W., *Environ. Sci. Technol.* 1986, 20, 376–383.
- [20] Suter, M. J. F., Reiser, R., Giger, W., *J. Mass Spectrom.* 1996, 31, 357–362.
- [21] Reiser, R., Toljander, H. O., Giger, W., *Anal. Chem.* 1997, 69, 4923–4930.
- [22] León, V. M., Sáez, M., González-Mazo, E., Gómez-Parra, A., *Sci. Total Environ.* 2002, 288, 215–226.
- [23] Sarrazin, L., Arnoux, A., Rebouillon, P., *J. Chromatogr. A* 1997, 760, 285–291.
- [24] León, V. M., Gómez-Parra, A., González-Mazo, E., *Fresenius' J. Anal. Chem.* 2001, 371, 479–485.
- [25] Jorgenson, J. W., Lukacs, K. D., *Science* 1983, 222, 266–272.
- [26] Kim, J. B., Terabe, S., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003, 30, 1625–1643.
- [27] Quirino, J. P., Terabe, S., *J. Chromatogr. A* 2000, 902, 119–135.
- [28] Kanz, C., Nölke, M., Fleischmann, T., Kohler, E., Giger, W., *Anal. Chem.* 1998, 70, 913–917.
- [29] Riu, J., Barceló, D., *Analyst* 2001, 126, 825–828.
- [30] *Statgraphics*, version 7.0 Plus, Manugistics Inc. and Statistical Graphics Corporation, Rockville, MD 1994.
- [31] Analytical Methods Committee, *Analyst* 1994, 119, 2363–2366.
- [32] Currie, L. A., *Anal. Chim. Acta* 1999, 391, 105–126.
- [33] Del Olmo, M., Garballo, A., Nimer, M., López, I. et al., *Chromatographia* 2004, 60, 157–164.
- [34] Miller, J. C., Miller, J. N., *Statistics for Chemical Analysis*, Addison-Wesley Iberoamericana, Wilmington, DE 1993.
- [35] Nimer, M., Ballesteros, O., Navalón, A., Crovetto, G. et al., *Anal. Bioanal. Chem.* 2007, 387, 2175–2184.
- [36] Nimer, M., *Ph.D. Thesis*, University of Granada, Spain 2007.

ENVIRONMENTAL ANALYSIS

**Determination of Sulfophenyl Carboxylic Acids
in Agricultural Groundwater Samples by Liquid
Chromatography with Fluorescence Detection**

**I. Jiménez-Díaz, O. Ballesteros, A. Navalón, A. Zafra,
M. C. Fernández-Ramos, and J. L. Vílchez**

Research Group of Analytical Chemistry and Life Sciences,
Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences,
University of Granada, Granada, Spain

Abstract: We have developed an analytical method to determine six sulfophenyl carboxylic acids (SPC) in agricultural groundwater samples. It involves a solid-phase extraction (SPE) procedure and subsequent separation and determination using liquid chromatography with fluorescence detection (LC–FD). The quantification limits ranged between 0.7 and 1.2 ng ml⁻¹. The proposed method was proved satisfactorily for the detection and determination of these compounds in groundwater samples during a study into the biodegradation of linear alkylbenzene sulfonates (LAS) in an agricultural soil sampled from the irrigated plain to the west of Granada (Spain).

Keywords: Linear alkylbenzene sulfonates (LAS), liquid chromatography–fluorescence detection (LC–FD), solid-phase extraction (SPE), sulfophenyl carboxylic acids (SPC)

Received 13 March 2008; accepted 28 March 2008.

This work was supported by the Junta de Andalucía (Project of Excellence No. P06-FQM-01529). The authors are grateful to Petroquímica Española S.A. for its valuable contribution to this study. They also thank A.L. Tate for revising their English text.

Address correspondence to Alberto Navalón, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, Campus of Fuentenueva, E-18071 Granada, Spain. E-mail: anavalon@ugr.es

INTRODUCTION

Although in terms of surfactant tonnage used worldwide, soap is still used more than synthetic detergents, the great variety of end products in which the latter are involved shows just how spectacular their process development has been.

Out of the 20 million tons (mT) of surfactant consumed in the world in 2000, 10.5 mT corresponded to soap and the remaining 9.5 mT to synthetic detergents (Berna, Bengoechea, and Moreno 2004). With a volume in 2000 of 3.3 mT, linear alkyl sulfonates (LAS) accounted for some 34.7% of the total synthetic surfactants manufactured and used in the world.

Commercial LAS is a mixture of 20 different closely related isomers and homologues, each containing an aromatic ring sulfonated at the *para* position and attached to a linear alkyl chain, which usually varies from 10 to 13 carbon atoms.

LAS are almost always present in urban wastewater and can be found in many different environmental samples (Waters and Garrigan 1983; Kikuchi, Tokai, and Yoshida 1986). The majority of this wastewater is treated via domestic treatment plants where biodegradation of LAS may occur, but they may be introduced as pollutants into natural ecosystems through the direct application of untreated wastewater into irrigation and through the use of sewage sludge as a fertilizer on agricultural soils (Holt, Matthus, and Waters 1989). Moreover, LAS may enter the soil as a result of the use of pesticides because detergents are used as emulsifiers and as dispersing and spreading agents in pesticide formulations (Jensen 1999).

Knowledge about the microbial degradation pathway of LAS is still somewhat incomplete (Swisher 1987; Schöberl 1993; Denger and Cook 1999), but the most widely accepted mechanism consists of the ω -oxidation of the terminal carbon atom of the alkyl chain followed by successive β -oxidations.

As a result of this process, sulfophenyl carboxylic acids (SPC) are formed. They constitute the most abundant degradation intermediates of LAS. Chemical structures of the studied SPC are shown in Fig. 1.

Desulfonation may produce hydroxyphenyl carboxylic acids or phenyl carboxylic acids. At the end of the biodegradation process, the molecules are mineralized by bacteria (Larson 1990).

Swisher's distance principle maintains that the biodegradation rates of LAS increase concomitantly with an increase in the distance between the sulfonate group and the far end of the alkyl chain, and thus 2-phenyl C₁₂ LAS degrades faster than 6-phenyl C₁₂ LAS, and C₁₃ LAS degrades faster than C₁₀ LAS (Swisher 1963).

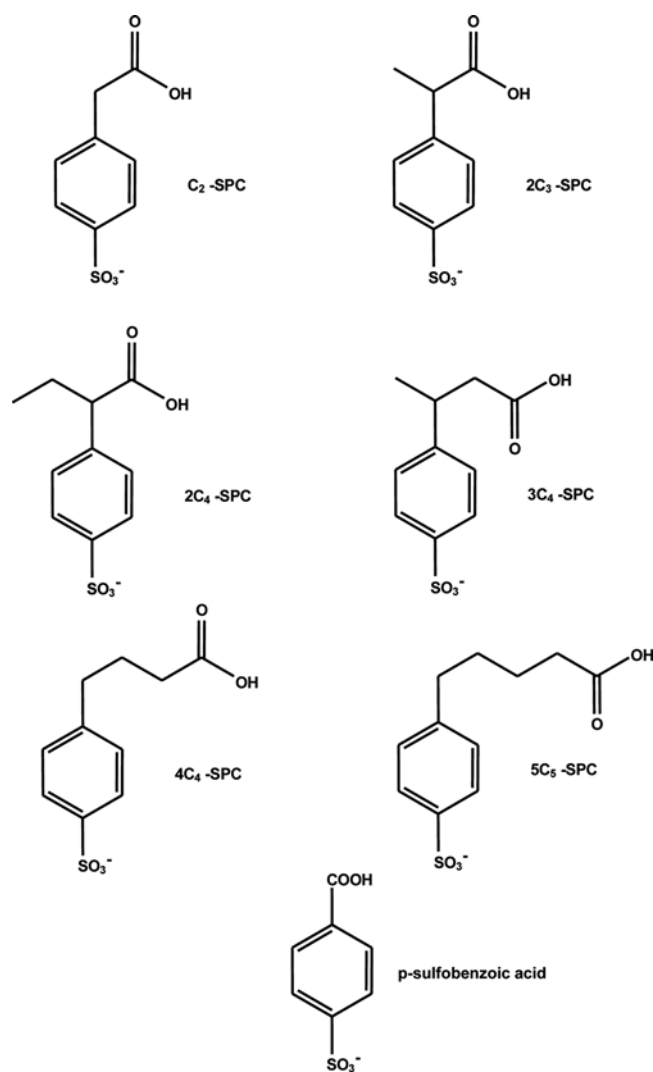


Figure 1. Chemical structure of the SPC studied and *p*-sulfobenzoic acid (internal standard).

LAS and SPC behavior depends largely on their molecular properties and on the medium into which the effluent containing them is discharged. As a result of the surfactant nature of LAS, transport mechanisms involved in the dispersion of LAS allow them to accumulate first on the surface of the aqueous medium (González-Mazo, Forja, and

Gómez-Parra. 1998; Terzic, Hrsak, and Ahel 1992) and make them show a notable capacity for adsorption by sediments and suspended solids, both in continental ecosystems and in the marine medium. SPC are not surfactant in character, being more polar compounds, and must show lower affinities with particulate matter. Therefore differences in the behavior of LAS and SPC (transport, distribution, and degradation) come from differences in their physicochemical properties.

Determination of the levels of the main degradation intermediates of LAS is a very relevant question. The toxicity of LAS toward organisms has been proven (Bressan et al. 1989; Argese et al. 1994) and abundant release in an aquatic environment induces severe ecological problems. The biodegradability of LAS nevertheless decreases its toxic effects. Although the toxicity of SPC are not known with any certainty, it was found that SPC give LC_{50} values that are 120–240% higher than that of LAS (Kimerle and Swisher 1977).

The determination of SPC relies on different techniques: gas chromatography with mass spectrometric detection (GC–MS) (Ding, Lo, and Tzing 1998); liquid chromatography with UV detection (LC–UV) (Sarrazin, Arnoux, and Rebouillon 1997), fluorescence detection (LC–FD) (León, González-Mazo, and Gómez-Parra 2000; León, Gómez-Parra, and González-Mazo 2001; León et al. 2002) and mass spectrometric detection (LC–MS) (Riu et al. 2001); capillary electrophoresis with UV detection (CE–UV) (Kanz et al. 1998) and mass spectrometric detection (CE–MS) (Riu and Barceló 2001); and immunoassay (Estévez et al. 2005).

Because of the low concentration of analytes and the complexity of the matrices studied, a solid-phase extraction (SPE) procedure was used in most of the proposed methods to preconcentrate the analytes and clean-up of samples.

Sarrazin, Arnoux, and Rebouillon (1997) proposed a LC–UV method for the determination of C_{12} LAS, SPC (C_2 , $3C_3$, $4C_4$, $5C_5$, $6C_6$, and $7C_7$), and unsulfonated metabolites in natural water. It involves a solid-phase extraction procedure using C_{18} cartridges. Recoveries were higher than 90% for all SPC except for C_2 -SPC (30%), and the limits of detection were around 20 ng ml^{-1} .

Ding, Lo, and Tzing (1998) developed a GC–MS method to determine LAS and $4C_4$ -SPC in water samples that involved extraction by graphitized carbon black cartridges and esterification by a derivatization procedure. The quantification limit for both LAS and SPC was estimated to be 0.01 ng ml^{-1} (using 100 ml of sample). Recoveries were around 90%.

Kanz et al. (1998) developed a CE–UV method for the determination of the enantiomers of $2C_4$ -SPC and $3C_4$ -SPC (using α -cyclodextrin

as the chiral selector) in sewage effluents of a wastewater treatment plant. It involved solid-phase extraction with graphitized carbon black (Carbopack B). The detection limit was 1 ng ml^{-1} for every enantiomer.

León and associates (León, González-Mazo, and Gómez-Parra 2000; León, Gómez-Parra, and González-Mazo 2001; León et al. 2002) proposed a LC–FD method to determine LAS and SPC (from C_2 to C_{13}) in water and marine sediment samples. A previous solid-phase extraction was carried out using both SAX and C_{18} cartridges. Good recoveries were obtained ($>90\%$) except for C_3 -SPC and C_2 -SPC (5% and 20%, respectively). Furthermore, the relationship between fluorimetric response and concentration was not linear for these SPC, and so SPC with fewer than 4 carbon atoms could be detected but not quantified with this method. Detection limits were between 0.5 and 1 ng ml^{-1} .

Riu et al. (2001) proposed a LC–MS method to determine LAS and SPC in influent and effluent water samples and sludges from sewage-treatment plants. The SPC analyzed were C_2 , C_3 , C_4 , C_5 , C_8 , C_{10} , and C_{11} . In water samples their method involves a solid-phase extraction with the polymeric phase Isolute ENV+. Recoveries were from 60% to 97% except for C_2 -SPC, which was only 3%. Detection limits were between 0.03 and 0.2 g ml^{-1} , except for C_2 -SPC and C_3 -SPC (1 and 1.5 ng ml^{-1} , respectively).

Riu and Barceló (2001) also proposed a CE–MS method to determine LAS and SPC (from C_2 to C_{13}) in sewage-treatment plants. No calibration graphs were carried out for SPC and, therefore, they were only identified. The analysis time was very long (70 min).

Recently, Estévez et al. (2005) proposed a direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of short-chain SPC ($2C_3$, $2C_4$, $3C_4$, $2C_5$, $3C_5$, and $3C_6$). Preconcentration steps were unnecessary with this method, which achieved detection limits of around 0.15 ng ml^{-1} . The authors did not validate or apply their method.

We describe here a new LC–FD method for the simultaneous determination of six sulfophenyl carboxylic acids: (*p*-sulfophenyl)acetic (C_2), 2-(*p*-sulfophenyl) propionic ($2C_3$), 2-(*p*-sulfophenyl)butyric ($2C_4$), 3-(*p*-sulfophenyl)butyric ($3C_4$), 4-(*p*-sulfophenyl)butyric ($4C_4$), and 5-(*p*-sulfophenyl)valerianic acid ($5C_5$) (see Fig. 1). It involves an SPE step that results in good recoveries. The proposed method was successfully applied to the determination of these compounds in groundwater samples during a study into the biodegradation of LAS in an agricultural soil sampled from the irrigated plain to the west of Granada (Spain).

EXPERIMENTAL

Chemicals and Reagents

All reagents were analytical grade unless stated otherwise. Water ($18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) was purified with a Milli-Q plus system (Millipore, Bedford, MA, USA).

Commercial LAS was kindly supplied by Petroquímica Española S.A. (Madrid, Spain) as an aqueous sodium salt solution with an LAS content of 44.05% (w/w). The average molecular weight of the Na-LAS was 342.2 g mol^{-1} , and the distribution of the linear alkyl chain homologues was C_{10} , 14.14%; C_{11} , 32.72%; C_{12} , 29.74%; and C_{13} , 23.40%.

SPC standards were also kindly supplied by Petroquímica Española S.A. (in all cases, the purity was more than 96%). *p*-Sulfobenzoic acid, used as an internal standard, was bought from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain).

Stock solutions (100 mg l^{-1}) of each SPC and *p*-sulfobenzoic acid were prepared in deionized water and stored at 4°C in the dark. These solutions were stable for three months. Working standards were prepared just before use by appropriate dilution with deionized water.

Acetonitrile (HPLC gradient grade), formic acid, acetic acid, ammonia, *o*-phosphoric acid, dichloromethane (HPLC grade), and sodium dihydrogen phosphate were supplied by Panreac (Barcelona, Spain). Methanol (HPLC grade) was purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

Solvents and aqueous solutions used were filtered through $0.20 \mu\text{m}$ regenerated cellulose (Sartorius, Barcelona, Spain).

Isolute ENV+ ($200 \text{ mg}/3 \text{ ml}$) SPE adsorbent cartridges were purchased from Isolute Sorbent Technologies (Mid Glamorgan, UK).

Apparatus and Software

Liquid chromatography with FD analyses were made with an Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) 1100 series high performance liquid chromatograph equipped with a quaternary pump, an on-line degasser, an autosampler, an automatic injector with a loop of up to $100 \mu\text{l}$, a thermostated column compartment, and a fluorescence detector (flow-cell volume $8 \mu\text{l}$) connected on-line. ChemStation for LC 3D software (Agilent) was used for instrument control, data acquisition, and analysis.

All pH measurements were made with a Crison (Crison Instruments SA, Barcelona, Spain) combined glass-saturated calomel electrode, using an earlier calibrated Crison 2000 digital pH-meter.

A Büchi R-200 rotavapor (Flawil, Switzerland) equipped with a B-490 heating bath and a vacuum pump unit and a Hettich Universal 32 centrifuge (Tuttlingen, Germany) were also used.

A Supelco (Madrid, Spain) vacuum manifold for 12 columns connected to a Supelco vacuum tank and to a vacuum pump was used for SPE.

A Statgraphics software package (1994) was used for statistical analysis of the data and for regression analysis (linear model).

Sampling and Pretreatment of the Samples

A plot of 36 m² located in the irrigated plain of Granada (commonly known as the "Vega de Granada") was chosen to carry out the study. In this plot two series of three hydro-captors were placed at two different depths (25 and 50 cm). The first day of the study the plot was irrigated with 4799.21 of water containing 449.5 g of the commercial LAS (final concentration of LAS was 41.2 mg l⁻¹). The average lixiviation (leaching) time was estimated at 4 hr. Subsequent irrigations were made with the same quantity of water but without LAS on the sixth, the thirteenth, the twentieth, and the twenty-seventh day and the samplings were carried out on the second, seventh, fourteenth, twenty-third, and thirtieth days.

The water samples were collected using the previously mentioned hydro-captors and transferred to glass bottles (previously cleaned with chromic acid and washed with deionized water). A small volume (1 ml per 100 ml of sample) of formaldehyde was added to the samples as a bactericide and the usual precautions were taken to avoid contamination. Samples were centrifuged at 4000 rpm (2360 × g) for 10 min, decanted, and filtered through 0.20 μm regenerated cellulose membrane filters. Then, 100 ml of each water sample were concentrated in a rotary evaporator (rotavapor), up to 8 ml, approximately, placed into 10-ml calibrated flasks, and 1 ml of 500 mM phosphate buffer solution (pH 1.5) and 0.5 ml of the internal standard solution (100 mg l⁻¹) were then added. Finally, the samples were brought to 10 ml with deionized water. Analyses were made following the procedure described in the earlier section.

Basic Procedure

Solid-Phase Extraction Procedure

Prior to the extraction each Isolute ENV + SPE cartridge was activated with 6 ml of methanol and 6 ml of 50 mM phosphate buffer solution (pH 1.5). Subsequently the pretreated samples (10 ml) were passed

through the cartridges at a flow rate of 2–3 ml min⁻¹ and then dried under vacuum for 20 min. They were then eluted with 3 ml of methanol-dichloromethane mixture (9:1; v/v). The eluate was evaporated to dryness at 50°C under a stream of nitrogen. One milliliter of deionized water was added in order to resuspend the residue and the resulting extract was filtered through 0.20 µm regenerated cellulose and injected into the LC system.

Chromatographic Conditions

The various compounds were separated using a LiChrocart RP-18 column (250 mm × 4.6 mm i.d., 5 µm particle size) from Merck. The mobile phase was a gradient mixture of acetonitrile (solvent A) and 0.5 M formate buffer solution (solvent B). The initial composition was 5% A and 95% B and was kept stable for 15 min. The percentage of A was then increased to 8% over 2.5 min and kept stable for a further 10 min. Subsequently it was increased to 12% over 3.5 min and kept stable for 4 min before being reduced to the 5% of the initial analysis conditions over 2 min. The total run time was 37 min and the post-delay was 2 min. The flow rate was 1 ml min⁻¹, the injection volume 100 µl, and the temperature of column was maintained at 20 ± 1°C. Fluorescence detection was carried out at $\lambda_{\text{ex}} = 225$ nm and $\lambda_{\text{em}} = 310$ nm.

RESULTS AND DISCUSSION

Preconcentration Procedure

Due to the complex nature of agricultural groundwaters, an SPE was selected as appropriate to extract and preconcentrate analytes from the samples previously filtered.

The SPE procedure, described in the earlier procedure section, was optimized by the authors in a previous work (Jiménez-Díaz et al. 2008).

Liquid Chromatography Analysis

We studied different mobile phases in order to optimize the separation and peak shapes of all the compounds. The LC eluent had to be acidified to suppress the ionic mobility of the analytes. Formic acid/ammonium formate and trifluoroacetic acid/ammonium trifluoroacetate (both at pH 2.0) were tested as buffer solution. The best separation was obtained using a mobile phase containing acetonitrile (solvent A) and

0.5 M formate buffer solution (solvent B). Different pH-values of the buffer were also tested (2.0, 2.5, 3.0, 3.5, and 4.0). Retention times decreased concomitantly with a decrease in pH. Thus we chose a pH value of 2.0 to minimize the analysis time. Different linear gradients were tested. The best resolution was obtained using the linear gradient described in the chromatographic conditions section.

Lastly, we studied changes in the injection volume in order to improve the detection limits of the method. A range from 10 to 100 μl was assayed and no extra broadening of the peaks was observed, even at maximum value. Thus we chose 100 μl as the injection volume.

A typical chromatogram corresponding to a standard mixture of the SPC studied is shown in Fig. 2a.

Analytical Parameters

Calibration graphs for samples treated according to the basic procedure were constructed by injecting different standard solutions at growing concentrations. *p*-Sulfobenzoic acid was used as the internal standard. Calibration curves were constructed using the analyte/internal standard peak area ratio versus the concentration of analyte. The linearity of the calibration graphs was tested according to the Analytical Methods Committee (1994); the lack-of-fit test was applied to two replicates and three injections of each standard. Detection limits and quantification were calculated according to the IUPAC criterion (Currie 1999). The analytical and statistical parameters for each SPC studied are summarized in Table 1.

In order to determine the intra-day and inter-day repeatability, blank water samples were spiked at three concentrations (25, 50, and 75 ng ml^{-1}) and six analyses were made in 3 days. Recoveries were achieved by comparing the analytical results for extracted standard samples of water at the aforementioned concentrations with unextracted standards prepared at the same concentrations in blank extract representing 100% recovery. The results obtained are summarized in Table 2.

Validation and Application of the Method

The validation was carried out with well water from the aquifer of the "Vega de Granada". We confirmed, using the method proposed by Del Olmo et al. (2004), that the level of LAS in this water was minor according to the limit of detection found (21 ng ml^{-1}). The validation samples were prepared using 100 ml of this water spiked with SPC at the same concentration levels as the standards used for calibration and treated

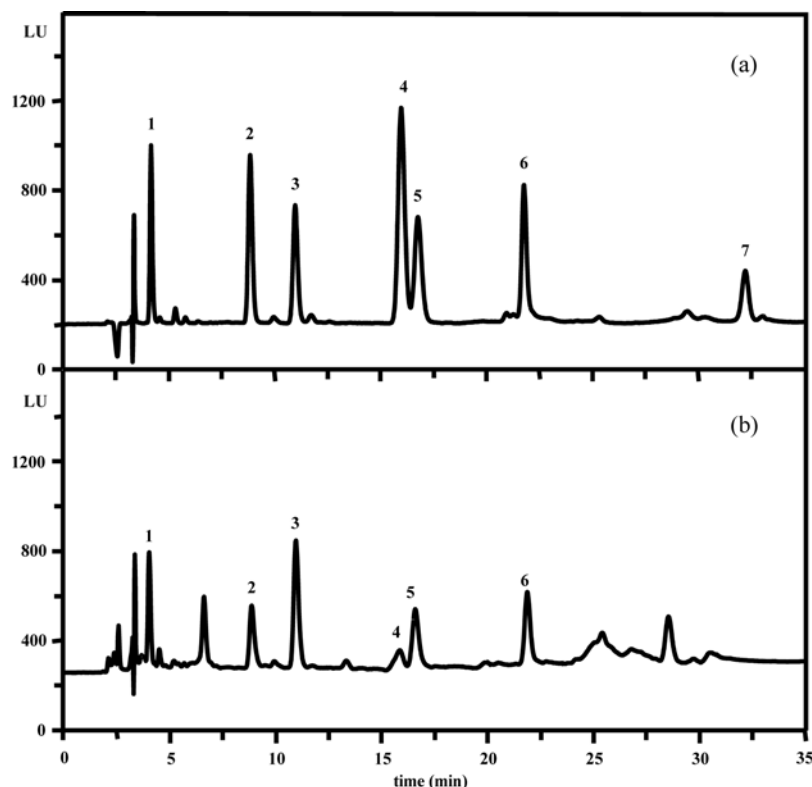


Figure 2. (a) Representative chromatogram of a standard mixture of the SPC studied and the internal standard. Concentration: 50 ng ml^{-1} for each SPC and 500 ng ml^{-1} for the internal standard. (b) Chromatogram for a groundwater sample collected on the sixth day after irrigation with water + LAS at 25 cm and spiked with the internal standard. Chromatographic conditions are described in the text. Identification peaks: (1) (*p*-sulfo)phenylacetic acid (C_2); (2) 2-(*p*-sulfo)phenyl)propionic acid (2C_3); (3) *p*-sulfo)benzoic acid (**IS**); (4) 4-(*p*-sulfo)phenyl)butyric acid (4C_4); (5) 3-(*p*-sulfo)phenyl)butyric acid (3C_4); (6) 2-(*p*-sulfo)phenyl)butyric acid (2C_4); (7) 5-(*p*-sulfo)phenyl)valerianic acid (5C_5).

as these standards, according to the procedure described. First, to evaluate the “matrix effect” we made a statistical comparison between the slopes and intercepts obtained from the two calibration graphs. The results show that there were no significant statistical differences between the slopes and intercepts. Next, the validation of the method for this water sample was tested using a recovery test (Student-*t* test) (Miller and Miller 1993). Well water samples were spiked at different levels: 5, 10, 20, 40, and 80 ng ml^{-1} for each SPC. As the P-values calculated in

Table 1. Analytical and statistical parameters

Parameter	C ₂	2C ₃	2C ₄	3C ₄	4C ₄	5C ₅
Intercept (<i>a</i>)	0.0062	0.0025	0.0002	-0.0007	0.0268	-0.0080
Intercept standard deviation (<i>S_d</i>)	0.0024	0.0064	0.0034	0.0047	0.0070	0.0050
Slope (<i>b</i>) (ml ng ⁻¹)	0.0305	0.0637	0.0620	0.0770	0.1271	0.0625
Slope standard deviation (<i>S_b</i>)	0.0002	0.0004	0.0002	0.0003	0.0004	0.0003
Regression standard deviation (<i>S_{y/x}</i>)	0.0103	0.0282	0.0146	0.0207	0.0303	0.0216
Lack-of-fit test (<i>p</i> -value, %)	88.0	56.1	64.9	28.4	12.6	37.3
Correlation coefficient (<i>r</i> ²) (%)	99.92	99.86	99.96	99.95	99.96	99.92
Linear dynamic range (ng ml ⁻¹)	1-100	1-100	1-100	1-100	1-100	1-100
Detection limit (ng ml ⁻¹)	0.3	0.4	0.2	0.2	0.2	0.3
Quantification limit (ng ml ⁻¹)	1.1	1.2	0.7	0.8	0.7	1.0

Table 2. Intraday and interday recovery (%) and precision (RSD, %)*

Compound		Concentration level (ng ml ⁻¹)		
		25	50	75
C ₂	Day 1	64 (2)	61 (2)	63 (2)
	Day 2	61 (2)	63 (1)	62 (2)
	Day 3	63 (1)	62 (1)	61 (2)
2C ₃	Day 1	74 (2)	72 (2)	75 (2)
	Day 2	76 (1)	74 (2)	76 (1)
	Day 3	77 (2)	75 (2)	73 (2)
2C ₄	Day 1	94 (2)	92 (3)	92 (2)
	Day 2	96 (3)	94 (2)	93 (1)
	Day 3	92 (2)	95 (2)	91 (2)
3C ₄	Day 1	84 (2)	80 (2)	81 (2)
	Day 2	81 (2)	82 (1)	84 (2)
	Day 3	85 (3)	83 (2)	82 (2)
4C ₄	Day 1	74 (2)	75 (2)	76 (2)
	Day 2	77 (2)	77 (2)	78 (3)
	Day 3	75 (1)	78 (2)	74 (2)
5C ₅	Day 1	86 (2)	88 (2)	85 (3)
	Day 2	89 (3)	86 (2)	87 (2)
	Day 3	86 (2)	85 (3)	88 (2)

*Mean value of six determinations. RSD (%): relative standard deviation.

all cases were greater than 0.05, the null hypothesis appears to be valid, i.e., recoveries are close to 100% (see Table 3).

We used the proposed method for determination of SPC in groundwater samples (at two different depths) in an agricultural soil from the irrigated plain of Granada in order to evaluate the biodegradation of LAS. The program of irrigation and sampling was described in previous sections.

Previously, we determined LAS at different depths (surface, 10, 20, 30, 40, 50, and 60 cm) in the soil of the selected plot using the proposed method by Nimer et al. (2007). The results confirmed that the level of LAS in these soil samples was under the limit of detection found: 0.05 mg kg⁻¹.

As an example, the obtained chromatogram for a water sample taken at a depth of 25 cm on the sixth day (Day 7, Table 4) after irrigation with water + LAS is shown in Fig. 2b.

Also, during the biodegradation study we also determined total LAS in the groundwater samples using the method proposed by Del Olmo et al. (2004).

Table 3. Results of recovery assays in well water samples to check the accuracy of the proposed method

Compound	Spiked (ng ml ⁻¹)	Found* (ng ml ⁻¹)	Recovery (%)	<i>t</i>	<i>P</i> (%)
C ₂	5	5.0 ± 0.1	99	1.12	31
	10	10.1 ± 0.1	101	1.03	35
	20	20.0 ± 0.2	100	0.54	61
	40	40.1 ± 0.6	100	0.59	58
	80	79.5 ± 0.8	99	1.47	20
2C ₃	5	5.0 ± 0.1	100	0.54	61
	10	10.0 ± 0.1	101	1.50	19
	20	19.9 ± 0.2	100	1.43	21
	40	40.3 ± 0.7	101	0.97	38
	80	80.3 ± 0.9	100	0.76	48
2C ₄	5	5.0 ± 0.1	100	0.34	75
	10	9.9 ± 0.2	99	1.01	36
	20	19.8 ± 0.3	99	1.94	11
	40	40.4 ± 0.6	101	1.39	22
	80	80.1 ± 0.5	100	0.71	51
3C ₄	5	5.0 ± 0.1	101	0.94	39
	10	9.9 ± 0.1	100	1.16	30
	20	19.9 ± 0.3	99	1.25	27
	40	40.1 ± 0.5	100	0.62	57
	80	79.5 ± 0.6	99	2.00	10
4C ₄	5	5.0 ± 0.1	100	0.27	80
	10	10.0 ± 0.1	100	0.80	46
	20	19.9 ± 0.2	99	1.52	19
	40	40.2 ± 0.4	101	1.36	23
	80	79.8 ± 0.7	100	0.70	52
5C ₅	5	5.0 ± 0.1	99	0.88	42
	10	9.9 ± 0.1	101	1.50	19
	20	20.1 ± 0.3	101	1.03	35
	40	39.7 ± 0.5	99	1.69	15
	80	79.6 ± 0.8	100	1.33	24

*Mean value ± standard deviation of six determinations.

The obtained results, summarized in Table 4, show that LAS are biodegraded during the lixiviation process, and we found levels of different metabolites (SPC) in the groundwater samples collected into the hydro-captors. This study, together with others focused on the determination of LAS in both soil (Nimer et al. 2007) and groundwater (Nimer 2007) at different depths may be considered as an experimental demonstration that LAS are practically biodegraded before reaching the saturated zone of the aquifer. It would seem then that when the

Table 4. Evolution of the different SPC levels in groundwater samples after irrigations

Program	Concentration at 25 cm (ng ml ⁻¹)										Concentration at 50 cm (ng ml ⁻¹)				
	C ₂	2C ₃	2C ₄	3C ₄	4C ₄	5C ₅	LAS*	C ₂	2C ₃	2C ₄	3C ₄	4C ₄	5C ₅	LAS*	
Day 1	<LOQ	2	Irrigation with water + LAS	<LOQ	<LOQ	<LOQ	10.1	<LOQ	<LOQ	Irrigation with water + LAS	13	10	<LOQ	7.3	
Day 2	49	17	Irrigation with water	32	<LOQ	<LOQ	1.4	6	3	Irrigation with water	4	6	<LOQ	0.6	
Day 6	8	3	Irrigation with water	30	25	5	0.1	11	3	Irrigation with water	4	6	23	0.1	
Day 13	3	<LOQ	Irrigation with water	5	7	14	0.1	3	<LOQ	Irrigation with water	10	10	<LOQ	0.1	
Day 14	3	<LOQ	Irrigation with water	2	4	4	0.1	3	<LOQ	Irrigation with water	3	5	<LOQ	0.1	
Day 20	<LOQ	<LOQ	Irrigation with water	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	Irrigation with water	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	
Day 23	<LOQ	<LOQ	Irrigation with water	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	Irrigation with water	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	
Day 27	<LOQ	<LOQ	Irrigation with water	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	Irrigation with water	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	
Day 30	<LOQ	<LOQ	Irrigation with water	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	Irrigation with water	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	

*Concentration expressed in µg ml⁻¹.
 <LOD: minor that the limit of detection.
 <LOQ: minor that the limit of quantification.

agricultural soil is irrigated with wastewater containing LAS they do not contaminate the soil.

Therefore, the lifetime of the main biodegradation intermediates of LAS appears to be short and they probably do not accumulate in the environment.

CONCLUSIONS

The results presented in this paper demonstrate that the determination of sulfophenyl carboxylic acids in groundwater samples using liquid chromatography with fluorescence detection can be used in evaluating the biodegradation of LAS. Our proposed method has shown good recoveries, quantification limits, and repeatability.

REFERENCES

- Analytical Methods Committee. 1994. Is my calibration linear? *Analyst*, 119: 2363–2366.
- Argese, E., Marcomini, A., Miana, P., Bettiol, C., and Perin, G. 1994. Submitochondrial particle response to linear alkylbenzenesulfonates, nonylphenol polyethoxylates and their biodegradation derivatives. *Environ. Toxicol. Chem.*, 13: 737–742.
- Berna, J.L., Bengoechea, C., and Moreno, A. 2004. “Laundry Products in Bar Form” (Chap. 6). In *Soaps, Detergents, Oleochemicals and Personal Care Products* (SODEOPEC), edited by L. Spitz. Champaign, IL: AOCS Press; 189–211.
- Bressan, M., Brunetti, R., Casellato, S., Fava, G.C., Giro, P., Marin, M., Negrisolò, P., Tallandini, L., Thomann, S., Tosoni, L., and Turchetto, M. 1989. Effects of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) on benthic organisms. *Tenside Deterg.*, 26: 148–158.
- Currie, L.A. 1999. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). *Anal. Chim. Acta*, 391: 105–126.
- Del Olmo, M., Garbalo, A., Nimer, M., López, I., De Ferrer, J.A., and Vilchez, J.L. 2004. Development of methodologies for different degrees of resolution of linear alkylbenzene sulfonates in groundwater and wastewater by liquid chromatography using sodium dodecyl sulphate. *Chromatographia*, 60: 157–164.
- Denger, K. and Cook, A.M. 1999. Linear alkylbenzenesulfonate (LAS) bioavailable to anaerobic bacteria as a source of sulfur. *J. Appl. Microbiol.*, 86: 165–168.
- Ding, W.H., Lo, J.H., and Tzing, S.H. 1998. Determination of linear alkylbenzenesulfonates and their degradation products in water samples by gas

- chromatography with ion-trap mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 818: 270–279.
- Estévez, M.C., Galve, R., Sánchez-Baeza, F., and Marco, M.P. 2005. Direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of the highly polar short-chain sulfophenyl carboxylates. *Anal. Chem.*, 77: 5283–5293.
- González-Mazo, E., Forja, J.M., and Gómez-Parra, A. 1998. Fate and distribution of Linear Alkylbenzene Sulfonates in the littoral environment. *Environ. Sci. Technol.*, 32: 1636–1641.
- Holt, M.S., Matthus, E., and Waters, J. 1989. The concentrations and fate of linear alkylbenzene sulphonate in sludge amended soils. *Water Res.*, 23: 749–759.
- Jensen, J. 1999. Fate and effects of linear alkylbenzene sulphonates (LAS) in the terrestrial environment. *Sci. Tot. Environ.*, 226: 93–111.
- Jiménez-Díaz, I., Ballesteros, O., Vílchez, J.L., and Navalón A. 2008. Determination of sulfophenyl carboxylic acids in agricultural groundwater samples using capillary electrophoresis with ultraviolet absorption detection. *Electrophoresis*, 29: 516–525.
- Kanz C., Nölke, M., Fleischmann, T., Kohler, H.P.E., and Giger, W. 1998. Separation of chiral biodegradation intermediates of linear alkylbenzene-sulfonates by capillary electrophoresis. *Anal. Chem.*, 70: 913–917.
- Kikuchi, M., Tokai, A., and Yoshida, T. 1986. Determination of trace levels of linear alkylbenzenesulfonates in the marine environment by high-performance liquid chromatography. *Water Res.*, 20: 643–650.
- Kimerle, R.A. and Swisher, R.D. 1977. Reduction of aquatic toxicity of linear alkylbenzenesulfonate (LAS) by biodegradation. *Water Res.*, 11: 31–37.
- Larson, R.J. 1990. Structure-activity relationships for biodegradation of linear alkylbenzenesulfonates. *Environ. Sci. Technol.*, 24: 1241–1246.
- León, V.M., González-Mazo, E., and Gómez-Parra, A. 2000. Handling of marine and estuarine samples for the determination of linear alkylbenzene sulfonates and sulfophenylcarboxylic acids. *J. Chromatogr. A.*, 889: 211–219.
- León, V.M., Gómez-Parra, A., and González-Mazo, E. 2001. Determination of sulfophenylcarboxylic acids in marine samples by solid-phase extraction then high-performance liquid chromatography. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 371: 479–485.
- León, V.M., Sáez, M., González-Mazo, E., and Gómez-Parra, A. 2002. Occurrence and distribution of linear alkylbenzene sulfonates and sulfophenylcarboxylic acids in several Iberian littoral ecosystems. *Sci. Tot. Environ.*, 288: 215–226.
- Miller, J.C. and Miller, J.N. 1993. *Statistics for Chemical Analysis*. Wilmington, DE: Addison-Wesley Iberoamericana.
- Nimer, M. 2007. *PhD Thesis*. University of Granada, Spain.
- Nimer, M., Ballesteros, O., Navalón, A., Crovetto, G., Verge, C., López, I., Berna, J.L., and Vílchez, J.L. 2007. New sample treatment for determination of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in agricultural soils by liquid chromatography with fluorescent detection. *Anal. Bioanal. Chem.*, 387: 2175–2184.

- Riu, J. and Barceló, D. 2001. Determination of linear alkylbenzene sulfonates and their polar carboxylic degradation products in sewage treatment plants by automated solid-phase extraction followed by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Analyst*, 126: 825–828.
- Riu, J., Martínez, E., Barceló, D., Ginebreda, A., and Tirapu LL. 2001. LC-MS determination of linear alkylbenzene sulfonates and their carboxylic degradation products in influent and effluent water samples and sludges from sewage-treatment plants. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 371: 448–455.
- Sarrazin, L., Arnoux, A., and Rebouillon, P. 1997. High-performance liquid chromatographic analysis of a linear alkylbenzenesulfonate and its environmental biodegradation metabolites. *J. Chromatogr. A*, 760: 285–291.
- Schöberl, P. 1993. In *Die Tenside*, edited by Kosswig, K. and Stache, H. München, Germany: Carl Hanser Verlag; 407–464.
- Statgraphics, version 7.0 Plus. 1994. Manugistics Inc. and Statistical Graphics Corporation, Rockville, MD.
- Swisher, R.D. 1963. The chemistry of surfactant biodegradation. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 40: 648–656.
- Swisher, R.-D. 1987. *Surfactant Biodegradation*, 2nd ed. New York: Marcel Dekker.
- Terzic, S., Hrsak, D., and Ahel, M. 1992. Enrichment and isolation of linear alkylbenzenesulfonate (LAS) degrading bacteria from estuarine and coastal waters. *Marine Pollut. Bull.*, 24: 199–204.
- Waters, J. and Garrigan, J.T. 1983. An improved microdesulphonation/gas liquid chromatography procedure for the determination of linear alkylbenzene sulphonates in U.K. rivers. *Water Res.*, 17: 1549–1562.