



Escuela
Politécnica
Superior

Desarrollo y validación de métodos analíticos basados en espectrometría de masas acoplada a triple cuadrupolo para análisis de sustancias prioritarias y emergentes en aguas mediante SPE y HPLC-MS/MS



Máster en Gestión Sostenible y
Tecnologías del Agua

Trabajo Fin de Máster

Autor:

Guillermo Serrano Navidad

Tutores:

Julio Llorca Porcel (Labaqua S.A.)

Nuria Boluda Botella (Universidad de Alicante)

Septiembre 2014



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

1. Motivos y objetivos

En las últimas décadas nuestra calidad de vida ha experimentado una clara mejoría, gracias en parte a la llamada “revolución química”.

Actualmente, se tienen cosechas más abundantes o se pueden consumir en cualquier momento productos de temporada que antes era sólo posible encontrar durante unos meses. También hay que resaltar la aparición de nuevos fármacos que han permitido que la calidad de vida y la longevidad de las personas aumenten año tras año.

En general esta revolución química ha constituido un hecho positivo, si bien en algunos casos, compuestos químicos que en un principio parecían inofensivos, con el paso del tiempo y tras diversos estudios se ha demostrado su toxicidad. Esto conlleva una necesidad clara de control de los distintos compuestos químicos que se emplean actualmente, ya que muchos de ellos pueden acumularse tanto en los seres humanos como en el medio ambiente. Uno de los principales focos de exposición de los seres humanos a estos compuestos son los distintos compartimentos medioambientales como las aguas, suelos de cultivo, sedimentos o los lodos utilizados en agricultura. Estas matrices pueden acumular los contaminantes que luego pueden pasar a los cultivos, pescados, etc. introduciéndose así finalmente en la cadena trófica.

El estudio de estos nuevos compuestos químicos, denominados contaminantes emergentes, se ha convertido en objetivo prioritario para la Organización Mundial de la Salud (OMS) y para las agencias de protección medioambiental (EPA). Es por ello que resulta necesario el desarrollo de métodos analíticos de elevada sensibilidad y selectividad para la determinación de estos compuestos.

En este trabajo se han estudiado los nonilfenoles y octilfenoles, compuestos utilizados fundamentalmente como surfactantes en detergentes. Fármacos de uso común utilizados por gran parte de la población. Hormonas anticonceptivas, etc.

La investigación se dividió en diferentes partes dedicadas al desarrollo de métodos analíticos para la detección y cuantificación de contaminantes emergentes.

Los objetivos a seguir:

- El desarrollo y validación de métodos analíticos que permitieran la separación y determinación de compuestos pertenecientes a estas familias de contaminantes, para los que se emplearon técnicas como, TD-GC-MS (SBSE), cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detección MS/MS.
- Utilización de métodos de extracción convencionales como son la extracción en fase sólida SPE.
- Determinación y cuantificación de los compuestos prioritarios en muestras de interés ambiental tales como aguas residuales procedentes de EDAR.

2. Dedicatoria

Este trabajo fin de máster va dedicado a todo el personal de Labaqua por permitirme la realización de este proyecto dentro de sus instalaciones y especialmente a todo el personal del Departamento de Cromatografía, por el buen trato, cariño y dedicación que me prestaron desde el primer día. Fue todo un placer aprender de un equipo de profesionales que ante todo persiguen la excelencia, la profesionalidad y el buen hacer en su trabajo. A Pedro, Jorge, Fele, Raúl, Jose, Beatriz, Sergio, Alicia y muy especialmente a Lorena Sanjuán por sus buenos momentos, paciencia y colaboración durante el desarrollo de todo el proyecto y a Julio Llorca por su valiosa ayuda en la dirección del proyecto y aporte de conocimientos.

A mi tutora Nuria Boluda por su atención, disponibilidad, orientación, seguimiento y ayuda aportada.

Un agradecimiento muy especial merece la comprensión, paciencia y el ánimo recibidos de mi familia, novia y amigos.

Y por último agradecer al proyecto LIFE+ AQUATIK “Nuevas tecnologías para la detección de contaminantes prioritarios” y al proyecto “Nuevas tecnologías para la detección y eliminación de microcontaminantes emergentes en aguas residuales” (DEMAGUA), por su financiación y por hacer posible que en los laboratorios se investigue con objetivos de protección y conservación del medioambiente.

A todos ellos, muchas gracias.

3. Índice

4. Introducción.....	6
4.1. Contaminantes emergentes.....	6
4.2. Clasificación.....	7
4.3. Alteradores endocrinos.....	9
4.4. Introducción al proyecto Life-Aquatik.....	12
4.5. Introducción al proyecto Demagua.....	16
5. Objetivos.....	17
5.1. Objetivos del Proyecto LIFE-Aquatik y resultados esperados.....	17
5.2. Objetivos referentes al proyecto Demagua.....	18
5.3. Objetivos de este Trabajo Fin de Master.....	18
6. Plan de trabajo en el que participa Labaqua en los proyectos Life-Aquatik y Demagua.....	19
7. Antecedentes.....	20
7.1. Descripción de la unidad Filtración-Concentración-Limpieza FCCU.....	20
7.2. Descripción de las etapas del FCCU.....	21
7.3. Pruebas preliminares del FCCU utilizando como adsorbente HLB.....	24
8. Técnicas utilizadas.....	26
8.1. Análisis por HPLC - MS/MS.....	26
8.2. Análisis por TD-GC-MS (SBSE).....	27
9. Desarrollo del trabajo y resultados obtenidos.....	29
9.1. Pruebas preliminares en la optimización del FCCU con C18.....	29
9.2. Prueba colectando los 3 últimos minutos.....	37
9.3. Determinación del volumen de ruptura del cartucho C18.....	39
9.4. Repetición de la prueba FCCU5.....	41
9.5. Prueba para la determinación del adsorbente adecuado para compuestos farmacéuticos en CFIS.....	42
9.6. Validación de los métodos.....	47

9.6.1. Validación de 4-n-nonilfenol, 4-tert-octilfenol y 4-nonilfenol mix utilizando C18 como adsorbente y Acetona como eluyente.....	50
9.6.1.1. Punto Bajo.....	50
9.6.1.2. Punto Alto.....	53
9.6.2. Resultados de la validación del sistema de preconcentración de microcontaminantes.....	55
9.7. Análisis de muestras reales mediante el método FCCU.....	58
9.7.1. Cartucho HLB.....	58
9.7.2. Cartucho C18.....	61
10. Conclusiones.....	62
11. Bibliografía.....	64

4. Introducción

4.1 Contaminantes emergentes

Muchos de los productos que utilizamos a diario (detergentes, perfumes, cremas) contienen gran cantidad de conservantes y aditivos que están siendo vertidos de manera continua al medio ambiente. La preocupación por conocer los efectos que puede tener la presencia de estos compuestos sobre el medio ambiente y sobre la salud humana ha ido en aumento en estos últimos años, y con ella el número de investigaciones al respecto, siendo actualmente línea prioritaria de investigación para la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Unión Europea (UE) y la US Environmental Protection Agency (USEPA).

En la mayoría de los casos, los contaminantes emergentes son sustancias que en la actualidad no se encuentran reguladas, pero que en función de los resultados que se obtengan en futuros estudios (toxicidad y presencia en el medio ambiente) pueden llegar a estarlo (Barceló, 2003). Estos compuestos se caracterizan por generar efectos negativos en los seres vivos y en el ecosistema, aún sin ser muy persistentes, ya que debido a su extendido uso, se introducen continuamente en el medio ambiente. De hecho, anualmente se introducen entre 200 y 1000 nuevas sustancias químicas. Son muy pocos los estudios que existen sobre los efectos que producen estos compuestos en el medio ambiente, por lo que se desconoce los riesgos asociados a su presencia en los distintos compartimentos en las que se acumulan (Benfenati y col., 2003; Eljarrat y col., 2003; Barceló y col., 2006). Por otra parte, son escasos los métodos analíticos que existen para su identificación, por lo que realmente se carece de datos ambientales reales. Por lo general no hay legislación sobre las concentraciones permitidas en distintos compartimentos medioambientales por lo que estos compuestos no se eliminan en las plantas de tratamiento de aguas residuales. Es posible, por tanto, encontrarlos en aguas de regadío que se emplean en plantaciones agrícolas o pueden permanecer en los lodos que se generan en estas plantas de tratamiento que posteriormente pueden ser utilizados en agricultura (Petrovic y col., 2004; Petrovic y col., 2006).

La publicación de libros como *“Primavera Silenciosa”*, escrito en 1962 por Rachel L. Carson (Carson, 1962) o *“Nuestro Futuro Robado”* de Theo Colborn, Dianne Dumanoski y Pete Myersen (Colborn y col., 2007) dieron la voz de alarma sobre estos compuestos que hasta el momento habían sido utilizados sin tener en cuenta los posibles efectos. En el primero de ellos se hacía referencia a cómo el DDT pasó de ser un potente pesticida a convertirse en un mortal contaminante, y en el segundo se relatan distintas experiencias de campo, pruebas de laboratorio, estadísticas humanas, etc. que muestran el peligro que pueden tener los alteradores endocrinos. De todas formas, aunque la presencia de estas sustancias sea causa de alarma, siempre es necesario analizar los pros y contras que presentan o que han presentado, porque aunque ahora se ha comprobado la toxicidad del DDT, durante la II Guerra Mundial salvó muchas vidas al reducir los casos de malaria y tal vez hoy también podría salvar muchas vidas en África. Los adelantos científicos casi siempre tienen un lado positivo y un lado negativo por lo que es necesario evaluar en cada momento el uso que se va a hacer de ellos de una manera objetiva.

4.2 Clasificación

Los contaminantes emergentes se pueden clasificar atendiendo a distintos parámetros, si bien la clasificación más aceptada es la que se realiza en función de sus usos y que se detalla a continuación (Barceló, 2003).

1. Fármacos. Cada vez es mayor la fabricación de nuevos fármacos de los que se conoce su función beneficiosa pero no así sus efectos posteriores sobre el medio ambiente. Entre ellos cabe destacar los siguientes:

- Antibióticos para uso médico y veterinario: Eritromicina, Lincomicina, etc.
- Analgésicos y anti-inflamatorios: codeína, ibuprofeno, ácido acetilsalicílico, etc.
- Fármacos psiquiátricos: diazepam, etc.
- Reguladores de grasas: bezafibrato.
- Esteroides y hormonas: que se utilizan para corregir deficiencias en su secreción natural. Ejemplos: estradiol, estrona, estriol, etc.

2. Anticonceptivos. Que contienen en su composición hormonas y esteroides como el estradiol y el estriol (píldoras anticonceptivas).

3. Productos de cuidado personal: Cada vez es mayor la importancia que se le da a la imagen y por ello éste es un mercado de gran producción y que genera un gran número de residuos.

- Perfumes: nitro, policiclos y macrociclos de almizcle.
- Cremas: benzofenona, parabenos.
- Repelentes de insectos: N, N- dietiltoluamida.

4. Antisépticos. Se utilizan con el fin de destruir la flora bacteriana cuando se aplican sobre heridas infectadas, instrumental quirúrgico, etc. Ejemplos: triclosan, clorofeno.

5. Surfactantes y metabolitos de surfactantes. Utilizados ampliamente en la fabricación de detergentes. Ejemplos: alquilfenol etoxilados, alquilfenol (nonilfenol y octilfenol), alquilfenol carboxilados.

6. Compuestos ignífugos. Debido al gran número de normativas que existen en temas de protección de incendios, es necesario el empleo de estos compuestos en la construcción (paredes, pinturas, etc.). Ejemplos: PBDEs, bisfenol A, tris 2-cloroetilfosfato.

7. Agentes y aditivos industriales. Utilizados en la industria para conferir buenas propiedades a distintos productos como pinturas, plásticos, etc. Ejemplos: EDTA, sulfonatos aromáticos, benzotriazoles, dioxano.

8. Aditivos de gasolinas. Que se adicionan para mejorar sus propiedades. Ejemplos: dialquil éteres, metil-terc-butyl-eter (MTBE).

9. Agentes desinfectantes: bromoácidos, bromoaldehidos, bromoacetnitrilos.

Además de los contaminantes emergentes mencionados hay que tener en cuenta que muchos compuestos pueden sufrir transformaciones y dar lugar a productos de degradación con un comportamiento distinto y una toxicidad que puede ser incluso superior a la del compuesto original. Este hecho ha sido comprobado en los nonilfenoles polyetoxilados, los cuales se degradan a nonilfenol y derivados etoxilados de cadena corta (NPEOx $x=1$ ó 2) que presentan una toxicidad mucho mayor que los compuestos originales (Richardson y col., 2009).

4.3 Alteradores endocrinos

Uno de los efectos más preocupantes que pueden tener estos contaminantes es su acción como alteradores endocrinos. Estos compuestos pueden alterar el sistema hormonal y por tanto la salud de los organismos vivos al mimetizar el comportamiento de los estrógenos naturales. Los alteradores endocrinos comprenden desde productos químicos sintetizados por el hombre hasta sustancias que se encuentran de manera natural en el medio ambiente.

Los alteradores endocrinos pueden actuar sobre el equilibrio hormonal de los seres vivos a distintos niveles:

- Mimetizar la acción de las hormonas.
- Antagonizar la acción de las hormonas.
- Alterar el patrón de síntesis y metabolismo hormonal.
- Modular los niveles de los receptores correspondientes.

Sus efectos varían en función del alterador y del ser vivo, pero existen una serie de características comunes como son:

- Los efectos de los contaminantes pueden ser distintos sobre el embrión, el feto, el organismo perinatal, niños o adultos.
- Los efectos se manifiestan con mayor frecuencia en la progenie que en el progenitor expuesto.
- El momento de la exposición en el organismo en desarrollo es decisivo para determinar el carácter, la gravedad y su evolución.
- Aunque la exposición crítica tenga lugar durante el desarrollo embrionario, las manifestaciones pueden no ser evidentes hasta la madurez del individuo.

Compuestos tales como dietilbestrol (DES), 2,2-bis-(p-clorofenil)-1,1,1-tricloroetano (DDT), e incluso compuestos naturales presentes en la soja o la granada, presentan efectos estrogénicos que se han ido descubriendo a lo largo de los años y en la mayoría de los casos después de que su acción hubiese hecho efecto. Este fue el caso del DES que durante más de 20 años (1938-1962) se administró durante el embarazo y que provocó malformaciones en más de 8 mil niños de 46 países.

Entre los posibles efectos que pueden ocasionar sobre la salud humana destacan: disminución de la calidad del espermatozoides, criptorquidismo e hipospadias, cáncer testicular, cáncer de próstata, cáncer de mama, endometriosis, efectos sobre la fertilidad, efectos sobre la relación de sexos, efectos sobre el tiroides, efectos neuroendocrinos, pubertad adelantada y obesidad (Pombo y col.).

Desde el año 1999 existe en la Unión Europea una comisión que establece los riesgos de este tipo de sustancias y ha elaborado distintos cuadros de actuación en los que se incluye el NP (Estrategia Comunitaria, 1999). En el 2007 se presentó la última actualización para la implantación de esta estrategia (Estrategia Comunitaria, 2007).

- Cuadro 1. Acciones prioritarias en relación con determinados grupos de sustancias recogidas en los cuadros siguientes y duración prevista (años).
- Cuadro 2. Sustancias de las que se tienen pruebas que confirman su capacidad efectiva o potencial para causar alteraciones endocrinas que no se encuentran legisladas. Ejemplos: Resorcinol, 2,4 diclorofenol, etc.
- Cuadro 3. Sustancias de las que se tienen pruebas que confirman su capacidad efectiva o potencial para causar alteraciones endocrinas que se encuentran legisladas. Ejemplos: Estireno, trembolona, nonilfenol, etc.
- Cuadro 4. Sustancias no suficientemente documentadas que se encuentran en investigación. Ejemplos: resmetrina, etc.

En la tabla 1 se resumen algunos de los alteradores endocrinos más conocidos así como sus usos, vías de exposición humana y aparición en el medio ambiente.

Tabla 1. Alteradores endocrinos, usos y exposición

Sustancias	Utilización	Exposición Humana	Exposición Medio Ambiente
DBT (ftalato)	Plastificante empleado en juguetes, laca de pelo, colas, recubrimientos, perfumes, etc.	Alimentos (envases), juguetes, cosméticos, cola, trabajadores durante la fabricación.	
Bisfenol A	Resina en empastes y recubrimientos dentales, alimentos enlatados.	Alimentos	
PBB	Compuesto ignífugo.	Exposición de trabajadores durante la fabricación	Producción (aguas residuales) y como residuos.
PCB	Equipos eléctricos, sistemas hidráulicos, pinturas, plásticos.	Alimentos	Emisión en la producción y en fase de residuo.
Resorcinol	Fabricación de adhesivos, tintas, fármacos, etc.	Exposición a través de la piel, a través de emisiones en la producción y como residuo, inhalación de humo de madera y tabaco.	Emisiones durante la producción y en la fase de residuo.
Estireno	Fabricación de adhesivos, tintas, cosméticos y fármacos.	Alimentos (aditivos, envases), juguetes, emisiones de vehículos.	Emisiones durante la producción y en la fase de residuo.
Tributilestaño	Pinturas fungicidas, conservante de la madera, desinfectante y como biocida para sistemas de refrigeración.	Trabajadores durante la producción	En la producción, aplicación y como residuo.
Percloroetileno	Limpieza y desengrase de piezas y superficies metálicas, limpieza en seco.	Exposición indirecta a través del aire y alimentos.	Emisiones durante producción y uso.
Endosulfan	Utilización en agricultura.	En alimentos	Emisiones durante el uso y la producción.
Nonilfenol	Materia prima para plásticos y nonilfenoles polietoxilados utilizados como surfactantes.	Envases y muestras medioambientales.	Producto de degradación de los nonilfenoles polietoxilados.

4.4 Introducción al proyecto Life-Aquatik “Nuevas tecnologías para la detección de contaminantes prioritarios”

La Unión Europea es cada vez más exigente con los Estados miembros para que sus aguas tengan un ‘buen estado ecológico y químico’. Para ello creó la Directiva Marco del Agua (DMA) 2000/60/EC, donde se incluyó una lista de contaminantes prioritarios cuya presencia ha de ser monitorizada y limitada en las masas de agua, ya que pueden suponer un riesgo para el medio y la salud humana. Esta lista se va actualizando periódicamente con nuevos compuestos y con límites de concentración más restrictivos; tras la última revisión, el número de contaminantes prioritarios está fijado en 45.

El proyecto Life+ Aquatik, cofinanciado por la Unión Europea a través del programa Life+, quiere ensayar y validar nuevas metodologías e instrumentos para el control in situ de los contaminantes prioritarios en salidas de depuradoras de una manera rápida, eficiente, inequívoca y económica. De esta forma, se ofrecería una alternativa a los métodos actuales de detección, que presentan resultados puntuales con un elevado tiempo de respuesta y altos costes, ya que se basan en el envío de muestras a laboratorios. El mayor problema es que cuando se obtiene el resultado del análisis, puede que una parte de los contaminantes ya se haya vertido al medio ambiente. En este caso, se requerirán medidas correctoras.

El proyecto, que comenzó en Septiembre de 2011 y durará hasta Febrero de 2015, está coordinado por CETaqua, Centro Tecnológico del Agua, junto con los socios AqualogyAqua Ambiente y Labaqua. La Universidad Complutense de Madrid, a través de su Grupo de Sensores Ópticos Químicos y Fotoquímica Aplicada, participa también como proveedor de la tecnología biosensora.

Las metodologías desarrolladas en el proyecto se utilizarán para la cuantificación de siete de los 45 contaminantes prioritarios seleccionados por su presencia global y, en particular, en la cuenca del río Llobregat.

Tabla 2. Contaminantes a estudio

Contaminante	Presente en:
Atrazina	Pesticidas
Diurón	
Isoproturón	
Simazina	
Nonilfenol	Detergentes
Octilfenol	
DEHP	Plásticos

La DMA establece en las normas de calidad ambiental (2008/105/CE) dos tipos de concentraciones:

- 1) la concentración máxima admisible (MAC) para detectar picos esporádicos de concentración
- 2) la concentración promedio calculada sobre un período seleccionado (AA).

El proyecto Life+ Aquatik propone una solución innovadora: la monitorización on-line de la concentración del compuesto para compararla con la MAC establecida, junto con el uso de muestreadores pasivos e integrativos para determinar su AA. De esta forma, no sólo se podría ver el nivel medio de contaminantes sino que se podrían detectar vertidos no controlados casi inmediatamente.

En la siguiente imagen se puede observar de forma esquemática cual sería el montaje.

Consta de 4 partes: Filtración, FCCU (Filtration-Concentration-Clean up Unit), Biosensor y Monitorización de resultados.

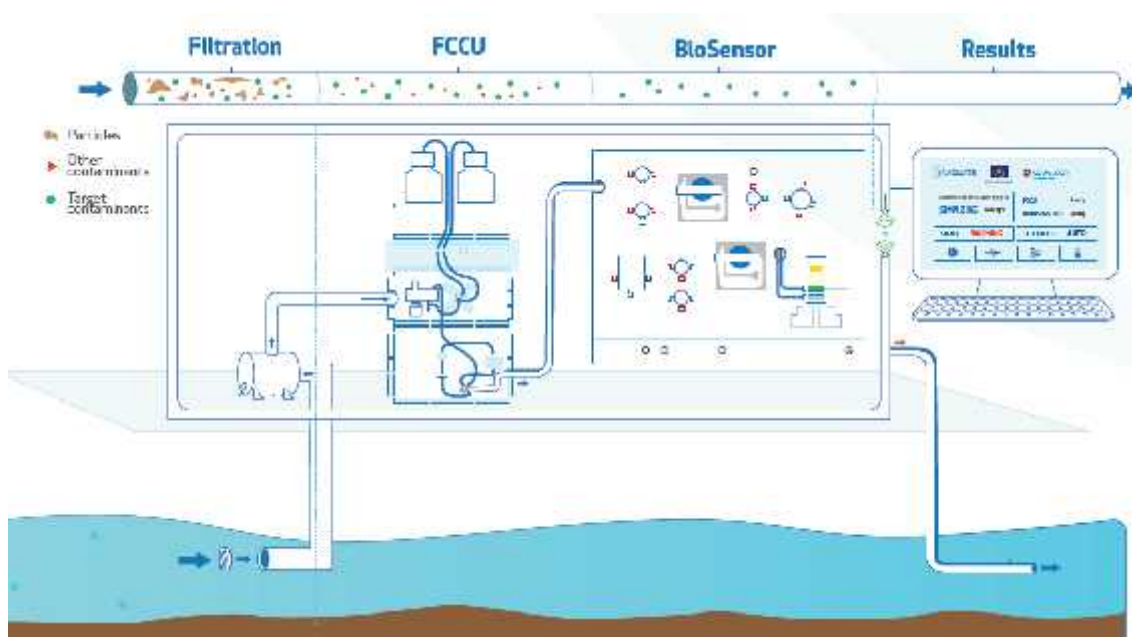


Figura 1. Diagrama del montaje con todas las partes integradas obtenido en la web http://www.cetaqua.com/uploads/pdf/Cetaqua_AquatikBrochure_TR_OK.pdf del proyecto Life-Aquatik.

Se ha desarrollado un prototipo integrado capaz de medir en un corto espacio de tiempo (3 horas) los contaminantes objetivo. La medida comienza por una toma automática de muestra que se filtra. Esta es la etapa de Filtración, se compone de un filtro que por el cual pasa el agua a analizar. Normalmente el agua que se va a analizar contiene sólidos en suspensión y partículas que han de ser retenidas para evitar posibles daños en las etapas posteriores del equipo, ya que, en caso de no realizar un filtrado del agua a analizar, obturarían los cartuchos de concentración y las bombas del equipo.

La siguiente etapa es la del FCCU. Esta etapa se desarrollará detenidamente ya que el proyecto principalmente está basado en los avances que se han hecho de ésta. No obstante de forma muy resumida lo que ocurre es que se pre-concentra el analito (extracción en fase sólida). Se hace pasar por un cartucho de concentración en el cual se queda retenido el analito de interés y el resto de contaminantes que no son de interés se

desechan sin quedar retenidos con la finalidad de eliminar interferentes y mejorar la sensibilidad de la detección posterior. Se concentra hasta 500 veces y pasa a las siguientes etapas, el Biosensor y la monitorización.



Imagen 1. Dispositivo FCCU obtenida de la web
<http://www.esamur.com/esamur/jornadas/ponencias/ponencia164.pdf> del proyecto Life-Aquatik.

Monitorización en línea

Ésta se realiza por medio de un bio-sensor óptico que reconoce la presencia del pesticida objetivo mediante microalgas inmovilizadas en una minúscula membrana. La especie de microalgas ha sido seleccionada con anterioridad por su sensibilidad a los compuestos objetivo sin ser genéticamente modificada. En el cabezal sensible del bio-sensor, dos cepas, una sensible y una resistente al analito, se enfrentan a la muestra de agua que proviene del pre-concentrador y, si en ella existiera el pesticida objetivo, se observaría una variación en la producción de oxígeno por las microalgas verdes que nos permite calcular la concentración del contaminante.

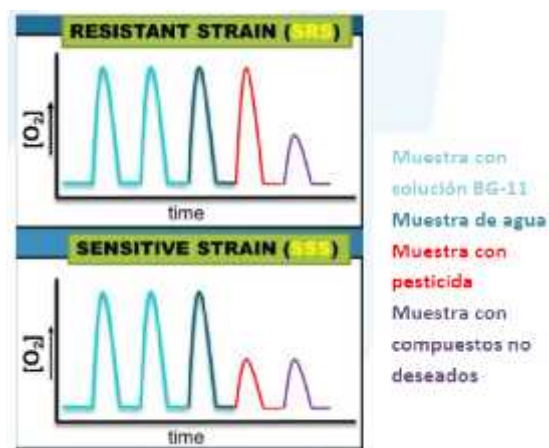


Figura 2. Monitorización del detector. Concentración de oxígeno frente al tiempo. Imagen obtenida de la web <http://www.life-aquatik.eu/> del proyecto Life-Aquatik

Todo este sistema está gobernado por un software desarrollado para el equipo de medida que automatiza los análisis y ofrece un control intuitivo mediante una interfaz propia.



Imagen 2. Imagen del dispositivo instalado en la depuradora de San Feliu por el proyecto Life Aquatik, Obtenida de la web http://www.cetaqua.com/uploads/pdf/Cetaqua_AquatikBrochure_TR_OK.pdf.

4.5. Introducción al proyecto Demagua “Nuevas tecnologías para la detección y eliminación de microcontaminantes emergentes en aguas residuales”

El dispositivo de análisis CFIS (Continuous Flow Integrative Sampler) patentado por Labaqua, nació de la necesidad de monitorizar las aguas de forma continua para que fuera algo representativo y a su vez de manera fácil y económica.

Hasta el momento la caracterización de las aguas se ha estado realizado mediante toma de muestras en distintos puntos a distintos tiempos utilizando sistemas de toma muestra automáticos. Las muestras recogidas se llevan a laboratorio y entonces son analizadas. Este proceso al final acaba siendo costoso y largo.

Otra alternativa a los toma muestras automáticos es el análisis utilizando muestreadores pasivos, pero éstos presentan una serie de inconvenientes debido a que se ven muy afectados por la turbulencia del medio y por la aparición de “biofilm” en su superficie, lo cual hace que su uso no sea del todo práctico.

Debido a estos inconvenientes se decidió desarrollar un dispositivo basado en el principio de los muestreadores pasivos (acumulación proporcional de contaminantes en un adsorbente) pero corrigiendo los efectos debidos a la turbulencia y aparición de biofilm.

Este dispositivo es el denominado CFIS, el cual inicialmente se desarrolló para la determinación de compuestos polares y apolares mediante la utilización de distintos adsorbentes. Y el cual en el presente proyecto se quiere adaptar y desarrollar para el análisis de fármacos y estrógenos mediante la utilización del adsorbente adecuado.



Figura 4. Dispositivo CFIS-Carcasa exterior Imagen extraída de la web <http://www.i-ambiente.es/?q=blogs/nuevos-metodos-de-muestreo-muestreadores-pasivos-e-integrativos>.

5. Objetivos

5.1. Objetivos del proyecto LIFE – Aquatik “Nuevas tecnologías para la detección de contaminantes prioritarios” y resultados esperados.

- Diseño y construcción de un dispositivo de control automatizado para la detección de sustancias prioritarias seleccionadas.
- Evaluar el correcto funcionamiento del dispositivo y evaluar el rendimiento en comparación con las tecnologías tradicionales de control off-line.
- Validar la viabilidad de muestreadores pasivos y pre-concentración in situ para la determinación de la concentración promedio.
- Difundir un nuevo enfoque científico.
- Evaluar la presencia de contaminantes emergentes en dos plantas de tratamiento de aguas residuales seleccionadas.
- Apoyar la aplicación de las políticas de la Unión Europea, especialmente la DMA y las directivas relacionadas.

La implantación de este proyecto dará lugar a los siguientes resultados:

- Un nuevo dispositivo automatizado que podría ser aplicado como una herramienta de monitoreo de rutina para la determinación de sustancias prioritarias seleccionadas, incluyendo todos los pasos de muestreo, filtrado, concentración y detección.
- Una herramienta valiosa para el control de las descargas (efluentes de aguas residuales y derrames relacionados), el cual, puede ser utilizado como sistema de alerta para detectar irregularidades en el rendimiento de la planta o incidentes extraordinarios de contaminación.
- Una reducción del tiempo necesario para el análisis en comparación con los métodos tradicionales en la determinación de los plaguicidas Simazina, Diurón e Isoproturón, los cuales están catalogados como contaminantes prioritarios en la DMA. El tiempo de respuesta esperado será del orden de 60 min.
- La demostración de la viabilidad de muestreo pasivo/preconcentración para la determinación la concentración promedio de alquilfenoles como el nonilfenol y el Octilfenol, y del ftalato DEHP y el pesticida Atrazina, todos ellos contaminantes emergentes en la DMA.

- Abastecimiento de instrumentación para medir rápidamente la concentración de contaminantes emergentes para los operadores, responsables en la toma de decisiones, agencias reguladoras y personas interesadas.
- Directrices para llevar de forma correcta el control en la operación y optimización de contaminantes emergentes. Además de información de interés acerca del nivel de contaminación que contienen las descargas procedentes de las EDAR.

5.2. Objetivos referentes al proyecto Demagua “Nuevas tecnologías para la detección y eliminación de microcontaminantes emergentes en aguas residuales”

- Desarrollo de sistemas de tratamiento descentralizados compactos para la detección y eliminación de microcontaminantes de aguas hospitalarias y farmacéuticas
- Desarrollo de sistemas de detección capaces de medir in situ y en tiempo real, de modo continuo y automático, la concentración de microcontaminantes prioritarios indicadores de la eficacia del tratamiento, con unos umbrales de detección inferiores a las limitaciones legislativas existentes o en proyecto.
- Adaptación del sistema CFIS (dispositivo desarrollado por Labaqua, patentado) para detección de compuestos farmacéuticos.

5.3. Objetivos de los trabajos realizados para el Trabajo Fin de Master

- Optimización del equipo FCCU para contaminantes emergentes (nonilfenoles, octilfenoles y ftalatos) con cartucho C18 y análisis off-line mediante TD-GC-MS (SBSE).
- Determinación del volumen de ruptura del cartucho C18
- Adaptación del CFIS (patentado por Labaqua) para obtener el adsorbente adecuado para compuestos farmacéuticos.
- Validación de los métodos analíticos estudiados para comprobar su trazabilidad
- Puesta en marcha con muestras de agua reales procedentes de EDAR para su verificación analítica a escala laboratorio.

6. Plan de trabajo en el que participa Labaqua en el proyecto Life-Aquatik y Demagua

De los siguientes puntos, los que se encuentran resaltados en negrita son los que se han realizado en este proyecto de manera que los que no están en negrita son los que ya estaban desarrollados por Labaqua S.A. antes de comenzar este proyecto o que aún se encuentran por desarrollar.

- **Desarrollo del módulo de Filtración-concentración-limpieza (FCCU).**
- Validación del sistema in-situ y fuera de las instalaciones. Comparación del sistema con las metodologías existentes.
- Montaje y puesta en marcha del módulo FCCU:
 - Diseño y construcción del módulo
 - **Puesta en marcha del módulo en el laboratorio**
 - Puesta en marcha del módulo en la planta de tratamiento
- Pruebas para la optimización en el laboratorio
 - Selección del material adsorbente a utilizar para cada una de las configuraciones
 - Optimización con cartuchos HLB.
 - **Optimización con cartuchos C 18 (off-line)**
 - Desarrollo de distintos métodos de análisis para distintas configuraciones (on-line - off-line)
- Pruebas para la optimización en la planta de tratamiento (in-situ)
 - Diseño del sistema de toma de muestra
 - **Pruebas módulo con agua real en planta de tratamiento**
- Adaptación del sistema CFIS para detección de compuestos polares y no polares
- **Adaptación del sistema CFIS para detección de compuestos farmacéuticos.**
- **Validación de métodos**

7. Antecedentes

Toda la información que aparece en este apartado, ha sido desarrollada por Labaqua y se expone porque es todo el trabajo realizado previo a la realización de este proyecto.

7.1. Descripción de la unidad Filtración-concentración-Limpieza (FCCU)

Para detectar microcontaminantes en agua de una forma efectiva, utilizando métodos online, es necesario el uso de sensores o biosensores. El sensor necesita tener disponible una solución previamente preparada para trabajar correctamente, y también para alcanzar los límites de cuantificación que demandan las nuevas directivas. No basta con preconcentrar la muestra que contiene los microcontaminantes, sino también realizar una filtración y limpieza, a fin de evitar interferencias en el sensor. Algunas propiedades fisicoquímicas de la matriz pueden interferir en la respuesta del sensor.

Este nuevo módulo FCCU se ha diseñado y conectado a la unidad de detección, no sólo para resolver todos estos problemas, sino también con el fin de aumentar la sensibilidad del biosensor y mejorar la gestión operativa del sistema.

Esta unidad de FCCU se compone principalmente de 2 bombas y cuatro válvulas, como se muestra a continuación:

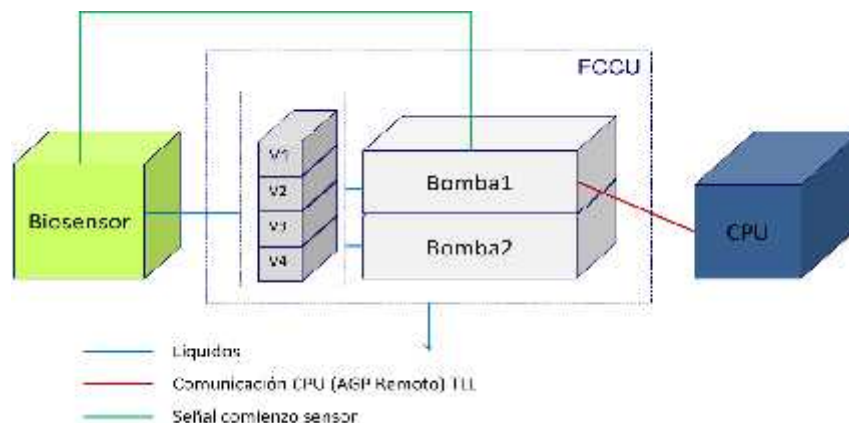


Figura 5. Diagrama de bloques del sistema FCCU

Las principales funciones del FCCU son: filtración de partículas, concentración de la muestra (más de 100 veces) y limpieza para evitar las interferencias de la matriz.

El FCCU incorpora una consola para programar y controlar las operaciones. Ésta permite una automatización y sincronización completa del proceso FCCU.

A continuación, se mostrará detalladamente como es el funcionamiento del FCCU y en que se basan las etapas. Posteriormente se mostrarán las aportaciones incorporadas y los cambios que se han desarrollado en el equipo a fin de mejorar el proceso y hacer la puesta a punto para prepararlo a su futuro acoplamiento al sistema completo y que funcione de la manera más óptima.

7.2. Descripción de las etapas del FCCU

Las etapas que constituyen el proceso de FCCU desarrollado por Labaqua se muestran a continuación:

1. Preparación del cartucho
 - a. Acondicionamiento
 - b. Equilibrado
2. Muestreo
3. Lavado
4. Análisis
 - a. Elución desecho
 - b. Elución
 - c. Elución desecho 2

Seguidamente, se describirá cada una de las etapas que componen el proceso.

1. Preparación del cartucho

Tiene lugar en los pasos de Acondicionamiento y Equilibrado. El disolvente atraviesa el cartucho dirección opuesta a cuando lo hace cuando pasa la muestra, es decir a contracorriente, de este modo se desechan posibles impurezas que han podido depositarse a la entrada del cartucho.

Consta de dos etapas:

- **Acondicionamiento**

La Bomba 1 arranca pasando un flujo de MeOH a través del cartucho. El flujo pasa a contracorriente a través del cartucho para eliminar cualquier partícula que pueda haberse depositado del análisis anterior. Al mismo tiempo, el metanol activa el cartucho y lo acondiciona para el análisis que va a comenzar.

- **Equilibrado**

La bomba 1 inyecta agua mili-Q a contracorriente a través del cartucho. El objetivo de esta etapa es eliminar el metanol del cartucho y de esta manera adaptarlo al medio en el que se encuentra la muestra.

2. Muestreo

En esta etapa la bomba 2 hace pasar la muestra a través del cartucho. Al pasar por el cartucho la muestra, quedan retenidos los analitos de interés y el resto atraviesan el cartucho sin quedar retenidos. La muestra que sale del cartucho es desechada sin pasar por el detector. De esta manera el cartucho se va cargando.

3. Lavado

Una vez ha pasado toda la muestra por el cartucho, en este han quedado retenidos los analitos de interés. La bomba 1 inyecta agua ultrapura por el cartucho para lavar cualquier resto de muestra y así, que el cartucho quede limpio para ser eluido.

4. Análisis

El proceso del análisis se compone de tres etapas:

- Ñ Elución desecho
- Ñ Elución
- Ñ Elución desecho 2

En este momento comienza la elución de los analitos que han quedado retenidos en el cartucho durante el muestreo. La bomba 1 impulsa un flujo de Acetona que entra al cartucho en el sentido opuesto al que entró la muestra. Durante este tiempo, se configurará el equipo para que las válvulas cambien de posición para que la elución entre al detector de forma selectiva es decir, al minuto concreto que sepamos que salgan los analitos. De esta manera se puede optimizar la cantidad de elución que entrará al detector y así conseguir que entre menos muestra y más concentrada.

- **Elución desecho**

El eluyente compuesto de acetona más los analitos, sale del cartucho y se mezcla con BG-11 (Una solución nutritiva para las microalgas) a través de un conexión en forma de T se aúnan los flujos. En este caso en concreto, el eluato está compuesto de un 5% de acetona. Tasa máxima que el biosensor formado por algas puede soportar.

Una válvula selecciona si el eluato va hacia el sensor o al desecho. En este caso, durante 5 minutos que dura la etapa de análisis, los tres primeros y el último van a desecho.

- **Elución**

Los analitos de interés retenidos salen del cartucho y solo durante un tiempo concreto pasa la elución al biosensor, con el fin de obtener un menor volumen de muestra y además un mayor factor de concentración.

- **Elución desecho 2**

Y por último se vuelve a desviar el eluyente al desecho para que no entre al detector.

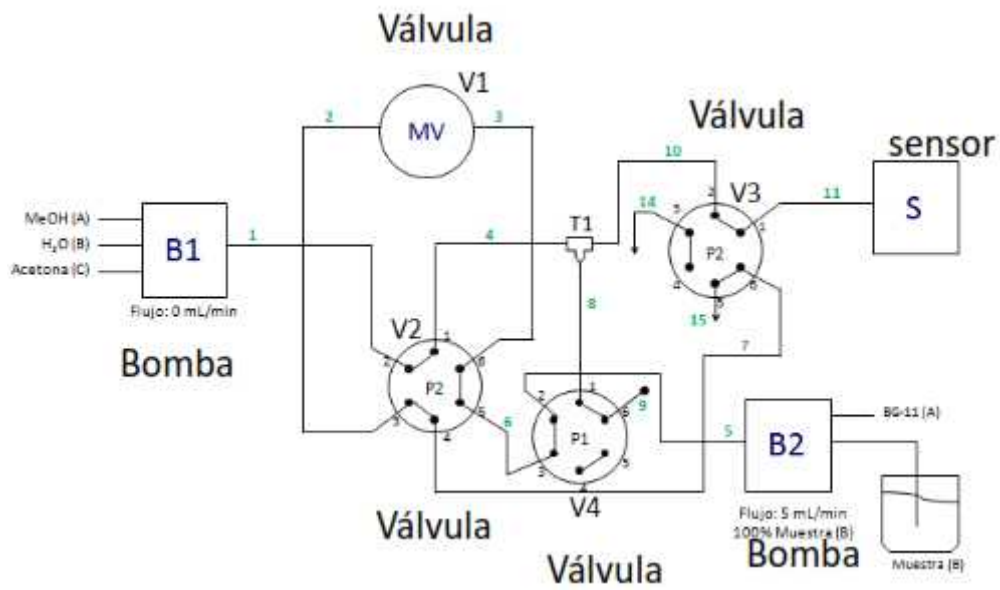


Figura 6: Diagrama de flujo del FCCU obtenido de la web www.life-aquatik.eu del proyecto “Sensores on-line para el control de contaminantes orgánicos en efluentes de EDAR”. Proyecto LIFE-AQUATIK.

7.3 Pruebas preliminares del FCCU utilizando como adsorbente HLB

Con el fin de diseñar el proceso para que el FCCU separe los contaminantes emergentes, en Labaqua S.A. se desarrollaron los dos primeros métodos previos al estudio que se va a desarrollar en este proyecto. Los analitos que se estudiaron fueron:

- Atrazina, Simazina, Diurón e Isoproturón utilizando como adsorbente HLB y acetona como eluyente.
- Diurón e Isoproturón, utilizando HLB como adsorbente y DMSO como eluyente.

Con el fin de optimizar el funcionamiento del FCCU con el cartucho de HLB y acetona como eluyente, se realizaron las siguientes pruebas preliminares. Los analitos son los que se muestran a continuación:

1. Simazina

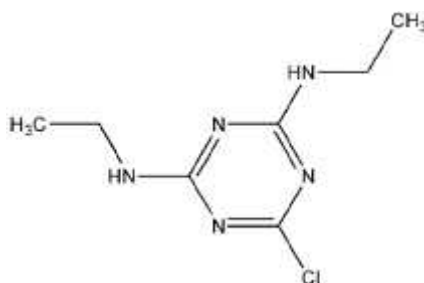


Figura 7. Molécula de Simazina.

2. Isoproturón

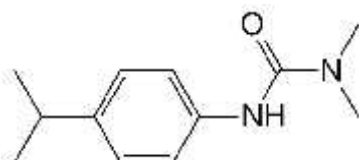


Figura 8. Molécula de Isoproturón.

3. Diurón

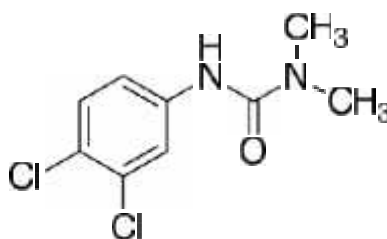


Figura 9. Molécula de Diurón.

Se realizaron pruebas que se desarrollaron en Labaqua S.A. previas al trabajo que se presenta en este proyecto.

Las condiciones finales de análisis fueron las siguientes:

El flujo óptimo de recuperaciones fue de 0.3 mL/min.

Durante los 5 minutos que dura la elución, los analitos salían del cartucho durante el minuto 4.

La velocidad a la que pasa la muestra por el cartucho no afecta a su retención.

Se podía realizar el experimento pasando 450 mL de muestra sin llegar al volumen de ruptura del cartucho.

Se repitió el experimento 5 veces y se repitieron los resultados favorablemente.

Se estimó que la columna podía realizar de 32 análisis sin variar los resultados.

Posteriormente se procedió a la validación de los métodos referentes al cartucho HLB cuyos resultados fueron exitosos y cuyos métodos eran trazables.

8. Técnicas utilizadas

8.1. Análisis por HPLC-MS/MS

- **Técnica analítica:**

Inyección directa y análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas con triple cuadrupolo.

- **Descripción de la técnica HPLC- MS/MS**

El equipo empleado para realizar los análisis fue un cromatógrafo de líquido Agilent 1200 acoplado a detector de masas con triple cuadrupolo Agilent 6410)

El análisis de fármacos y hormonas utilizando la técnica HPLC-MS/MS se detalla a continuación:

- Método de análisis para fármacos y hormonas **EPA Method 1694**
- Objetivo procedimiento: análisis de fármacos y hormonas por **SPE Online - HPLC-MS/MS**.
- Éstos compuestos se agrupan en distintos grupos para ser analizados:

Tabla 3. Métodos empleados para la determinación de fármacos y hormonas

Grupo	Compuestos	LOD (µg/L)	Preparación muestra	Fase Móvil HPLC	Modo detección
1 (Fármacos)	Sulfametoxazol	0.01	Se añade EDTA (50 mg/50mL de muestra) + filtrado muestra 0.22µm + 16µL/10mL muestra HCl 37% (pH 2) + PI	FM A: Agua ultrapura + 0.3% ácido fórmico + 0.1% formiato amónico FM B: Metanol:Acetonitrilo 1:1	ESI +
	Carbamazepina	0.01			
	Roxitromicina	0.01			
	Eritromicina	0.01			
	Trimetoprim	0.01			
	Diclofenaco	0.01			
	Azitromicina	0.01			
	Sulfatiazol	0.01			
	Ketoprofeno	0.03			
2 (Fármacos)	Tetraciclina	0.01		FM A: Metanol:Acetonitrilo 1:1 + 5mM ácido oxálico	ESI +
	Doxiciclina	0.01		FM B: Agua ultrapura + 5 mM ácido oxálico	
3 (Fármacos)	Naproxeno	0.01		FM A: Agua ultrapura + 0.1% acetato amónico+ 0.1% ácido acético	ESI -
	Ibuprofeno	0.03		FM B: Metanol:Acetonitrilo 1:1	
Hormonas	Estrona	0.3	Filtrado muestra 0.22µm + 40µL/10mL muestra NH ₃ 25% (pH 9) + PI	FM A: Acetonitrilo	ESI -
	Estradiol			FM B: Agua ultrapura + 0.1% NH ₃	
	Etinilestradiol				
	Estriol				

Columna (fármacos): Pursuit XRs Ultra 2.8 C8 50x20mm, T^a= 40°C

Columna (hormonas): XDB C18 1.8 4.6x50mm, T^a= 40°C

8.2. Análisis por TD-GC-MS (SBSE)

- **Técnica analítica.**

El método se basa en la extracción de la muestra mediante *Stir Bar Sorptive Extraction* (SBSE) y posterior análisis mediante desorción térmica y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (TD-GC-MS). Se ha seguido el método validado por LABAQUA S.A. (León et al., 2003; León et al., 2006; Llorca-Porcel et al., 2006). EL método de SBSE se basa en el empleo de unas barras cubiertas de polidimetilsiloxano que actúa como sorbente Estas barras se comercializan bajo el nombre de TwisterTM (Gerstel, Mülheim an der Ruhr, Alemania), y se han empleado las de dimensiones de 20 mm de longitud y 0.5 mm de espesor de film de polidimetilsiloxano (PDMS) con un volumen de polímero de 50 µL. Previamente a su uso las barras de PDMS son condicionadas en un tubo de termodesorción a 300°C durante 4 horas con un flujo de helio de 50 mL/min.

- **Descripción de la técnica**

El análisis de los compuestos extraídos por el TwisterTM se realiza mediante termodesorción directa en línea con un equipo de GC – MS, de acuerdo con el método validado por LABAQUA S.A. (León et al., 2003; León et al., 2006; Llorca-Porcel et al., 2006). La desorción de los TwisterTM se lleva a cabo en una unidad comercial de termodesorción TDS-2 (Gerstel, Mülheim an der Ruhr, Alemania) conectada a un sistema de inyección con vaporización de temperatura programada (PTV) CIS-4 (Gerstel, Mülheim an der Ruhr, Alemania). El inyector PTV se encuentra instalado en un equipo Agilent 6890 GC-5973 MS (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EEUU). La unidad TDS-2 está equipada con un automuestreador TDSA (Gerstel, Mülheim an der Ruhr, Alemania) con capacidad para 20 tubos de termodesorción.

Tras la extracción, los TwistersTM se retiran de las muestras de agua, se secan suavemente con papel absorbente y se introducen en tubos de vidrio de termodesorción. Dichos tubos se colocan en la bandeja del automuestreador TDSA y son sucesivamente introducidos en el módulo de termodesorción automáticamente. La temperatura se eleva

hasta 280 °C en la unidad TDS-2 durante 6 minutos bajo un flujo de helio de 75 mL/min en modo “solvent-venting” siendo arrastrados los compuestos volatilizados hasta el módulo PTV. En dicho módulo, se produce la crioconcentración de los mismos, disminuyendo la temperatura a 20 °C mediante nitrógeno líquido. La temperatura en el PTV se eleva finalmente a 280 °C y los compuestos son introducidos a una columna HP-5 MS (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EEUU) de 30 m de longitud × 0.25 mm de diámetro interno, con una película de 0.25 µm de grosor de 5% fenil - 95% polidimetilsiloxano. La columna se mantiene a 70 °C durante 2 minutos, se aplica una rampa de 30°C/min hasta 200 °C, manteniéndose esta última temperatura durante 1 minuto, y se incrementa a 3 °C/min hasta 280 °C, manteniéndose esta última durante 2 minutos. La detección se lleva a cabo usando una fuente de impacto electrónico (EI+) en modo de escaneo completo, en el rango de masa/carga 50-400, utilizando con un ión característico para la detección del pico de cada compuesto.

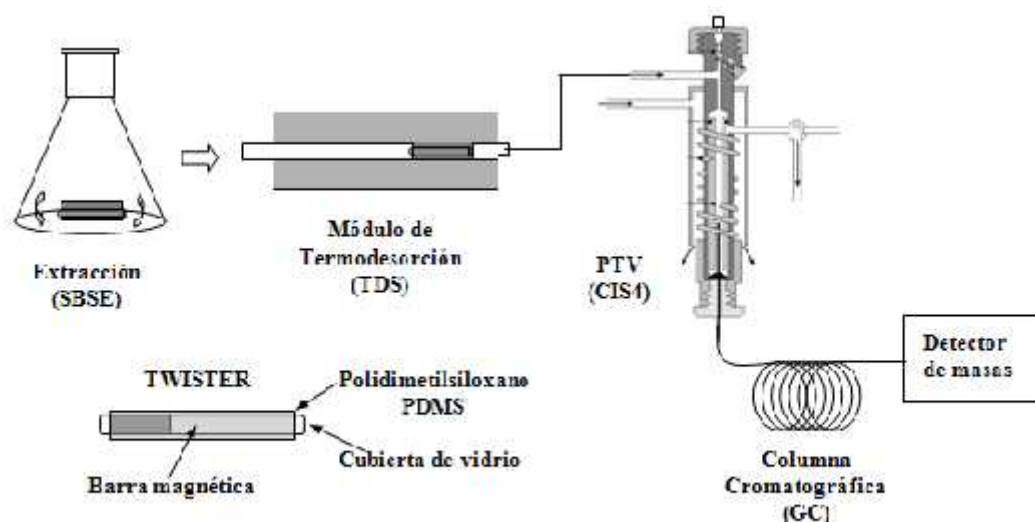


Figura 10. Sistema de desorción térmica acoplada a cromatografía de gases y espectrómetro de masas.

9. Desarrollo del trabajo y resultados obtenidos

En este apartado, se presenta el desarrollo y resultados del trabajo realizado por el autor del proyecto.

9.1 Pruebas preliminares en la optimización del FCCU con cartucho C18

Con el fin de optimizar el funcionamiento de FCCU, vamos a preparar una disolución que contenga DEHP, 4-nonilfenol-mix, 4-n-nonilfenol y 4-tert-octilfenol diluida en H₂O mili-Q a una concentración conocida. El objetivo es hacer pasar la muestra problema que se acaba de preparar simulando la muestra real, por un cartucho de concentración C-18. El objetivo de estas pruebas es calcular las recuperaciones que se obtienen después del proceso de extracción y optimizar el minuto exacto al que salen los analitos en el eluyente a fin de conseguir menos volumen de eluyente y más concentrado, en la medida de lo posible.

El cartucho utilizado es de tipo C-18 con un tamaño de partícula de 20 µm y 20x2 mm. Es un cartucho de extracción en línea.

Se preparó una disolución de 250 mL a una concentración de 10 µg/L a partir de las sustancias puras.

Los compuestos utilizados fueron:

- DEHP (Di (2-etilhexil) ftalato)

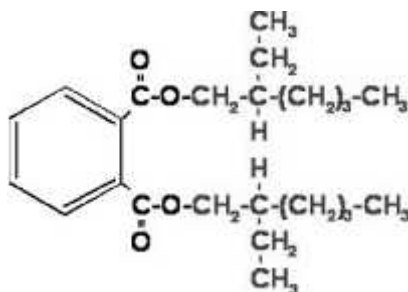


Figura 11. Molécula de DEHP.

- 4-nonilfenol-mix (mixto de nonilfenoles)

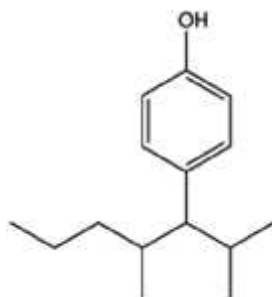


Figura 12. Molécula de nonilfenol.

- 4-n-nonilfenol

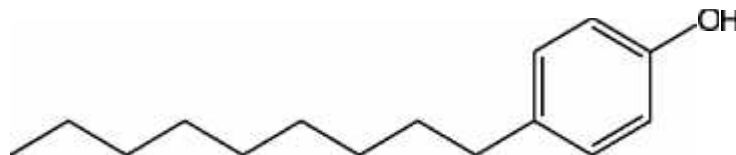


Figura 13. Molécula de 4-n-nonilfenol.

- 4-tert-octilfenol

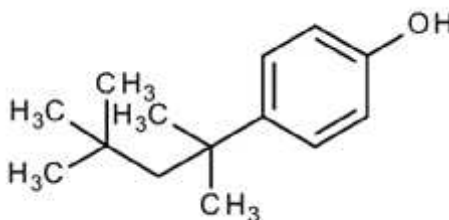


Figura 14. Molécula de 4-tert-octilfenol

En la CPU del FCCU se configuró una secuencia en la cual, se hacen pasar por el cartucho 10 mL de la muestra en cada una de las secuencias. La diferencia es que en la etapa de elución se modifica el tiempo de elución y el flujo. Los flujos y el tiempo de elución con los que se llevó a cabo el ensayo se muestran a continuación:

- Flujo 0.2 mL/min, 5 minutos
- Flujo 0.3 mL/min, 5 minutos
- Flujo 0.5 mL/min, 5 minutos
- Flujo 0.2 mL/min, 10 minutos
- Flujo 0.3 mL/min, 10 minutos
- Flujo 0.5 mL/min, 10 minutos

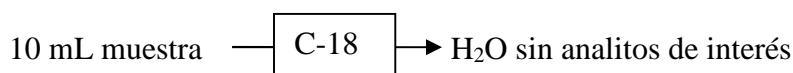
En la etapa de muestreo, que es común para todos los ensayos, la masa de cada analito se calcula de la siguiente manera

$$V \cdot [\text{analitos}] = m_{\text{analitos}}$$

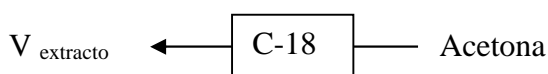
$$10 \text{ mL} \cdot 10 \mu\text{g/L} = 0.1 \mu\text{g} \text{ se pasan por el cartucho}$$

Si la recuperación fuera del 100% se recuperaría en el eluyente los 0.1 μg . Los pasos de la extracción son los siguientes:

1. Paso 1



2. Paso 2



Los volúmenes recogidos en cada experimento se muestran a continuación:

Tabla 4. Volúmenes recogidos durante los experimentos

Experimento	Volumen recogido (mL)
Flujo 0.2 mL/min, 5 minutos	1
Flujo 0.3 mL/min, 5 minutos	1.5
Flujo 0.5 mL/min, 5 minutos	2.5
Flujo 0.2 mL/min, 10 minutos	2
Flujo 0.3 mL/min, 10 minutos	3
Flujo 0.5 mL/min, 10 minutos	5

Los extractos, se recogieron en un vial para proceder a su análisis off-line con el fin de determinar las recuperaciones reales.

Se tomaron 3 alícuotas de la muestra inicial con la que se alimenta el equipo. Para determinar con exactitud los resultados, se procedió a un análisis por TD-GC-MS (SBSE).

La concentración del agua inicial que utilizamos de muestra se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 5. Concentración inicial en la muestra.

Concentración inicial en el agua muestra (ng/L)					
Compuesto	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio	RSD %
4-tert-octilfenol	7431	7929	8869	8076	9
4-nonilfenol mix	8140	8593.5	8229	8321	3
4-n-nonilfenol	2250.5	2339	2351.5	2314	2
DEHP	20502.5	16089.5	7469.5	14687	45

Para corroborar la validez de los datos hay que conocer la desviación estándar. La fórmula utilizada es:

$$S = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^2}$$

Una vez conocido el valor se introduce en la siguiente fórmula para calcular la desviación estándar relativa.

$$\%RSD = \frac{S}{\bar{X}} \cdot 100$$

Los valores de RSD% aparecen en la tabla anterior. Cabe destacar el valor tan alto con el que se muestra el di (2-etilhexil) ftalato. Esto puede ser debido en su mayor parte a que este compuesto se encuentra en altas concentraciones en el plástico con el que están fabricadas las puntas de las pipetas y las botellas de agua mili-Q con las que se enrasan las disoluciones. Por este motivo, a este compuesto no se le puede dar mucha importancia debido a que trabajamos a concentraciones tan bajas que la menor variación afecta muchísimo. Solo se puede asumir el error.

La masa adsorbida por el cartucho se calcula multiplicando la concentración que aparece en la tabla 6 por los 10 mililitros que pasan por el cartucho.

Tabla 6. Masa adsorbida por el cartucho C18

Compuesto	Masa adsorbida C18 (ng)
4-tert-octilfenol	80.8
4-nonilfenol mix	83.2
4-n-nonilfenol	23.1
DEHP	146.9

Cada uno de los extractos se analizó también mediante TD-GC-MS (SBSE). Con los resultados obtenidos sabemos las concentraciones de los extractos:

Tabla 7. Concentración de los extractos recogidos.

Compuesto	Concentración extractos (ng/L)					
	Flujo 0.2 mL/min 5 minutos	Flujo 0.3 mL/min 5 minutos	Flujo 0.5 mL/min 5 minutos	Flujo 0.2 mL/min 10 minutos	Flujo 0.3 mL/min 10 minutos	Flujo 0.5 mL/min 10 minutos
4-tert-octilfenol	80560	61144	31562	44800	23643	11260
4-nonilfenol mix	64640	58422	35536	42762	26103	12343
4-n-nonilfenol	17700	16832	9944	11872	7569	3365
DEHP	29795	54660	49040	52070	31467	26679

Con las concentraciones de los extractos, multiplicadas por el volumen de extracto con la que se realiza la etapa de elución, obtenemos la masa adsorbida en nanogramos por el cartucho C-18.

Tabla 8. Masa adsorbida por el cartucho C18

Compuest o	Masa adsorbida (ng)					
	Flujo 0.2 mL/min 5 minutos	Flujo 0.3 mL/min 5 minutos	Flujo 0.5 mL/min 5 minutos	Flujo 0.2 mL/min 10 minutos	Flujo 0.3 mL/min 10 minutos	Flujo 0.5 mL/min 10 minutos
4-tert- octilfenol	80.6	91.7	78.9	89.6	70.9	56.3
4- nonilfenol mix	64.6	87.6	88.8	85.5	78.3	61.7
4-n- nonilfenol	17.7	25.2	24.9	23.7	22.7	16.8
DEHP	29.8	82.0	122.6	104.1	94.4	133.4

Finalmente, como ya tenemos la masa adsorbida por el cartucho C18 y la masa que hay en el eluyente, podemos calcular las recuperaciones obtenidas por los 6 métodos diferentes con los que se realizaron las pruebas preliminares.

Tabla 9. Recuperaciones de las pruebas preliminares con C18.

Compuest o	% recuperación					
	Flujo 0.2 mL/min 5 minutos	Flujo 0.3 mL/min 5 minutos	Flujo 0.5 mL/min 5 minutos	Flujo 0.2 mL/min 10 minutos	Flujo 0.3 mL/min 10 minutos	Flujo 0.5 mL/min 10 minutos
4-tert- octilfenol	100	114	98	111	88	70
4- nonilfenol mix	78	105	107	103	94	74
4-n- nonilfenol	77	109	107	103	98	73
DEHP	20	76	49	44	64	91

Con los resultados obtenidos, se analizó cuál era la mejor elección para establecer el flujo y el tiempo de elución. Se decidió un flujo de acetona para extraer los analitos de 0.3 mL/min, durante un tiempo de 5 minutos, ya que como se puede comprobar en la tabla 9, es la opción que mejores resultados de recuperaciones dio.

Realmente la opción tomada es una buena elección debido a que cuanto menos tiempo tarde la fase de elución, más óptimo será el funcionamiento del equipo porque tiene que realizar muchas pruebas al día y además, cuanto antes se obtengan los resultados, antes se puede detectar un vertido puntual al medioambiente. Otra característica a favor es que el volumen de extracto que se obtiene es de 1.5 mL, por lo que el extracto irá altamente concentrado, objetivo del proceso.

Una vez se estableció el flujo y el tiempo al que se trabajará, se procedió a realizar una repetición del método para corroborar que los resultados son satisfactorios.

Se preparó una nueva disolución muestra y se desechó la de los análisis anteriores. Esta vez, se prepararon 250 mL a 10 µg/L a partir de las disoluciones madre de los compuestos que hay en el laboratorio. Las disoluciones madre se encuentran a 10 ppm por lo que se tuvieron que pipetear 250 µL. Se tomó una alícuota.

Se configuró el equipo para que repita el experimento 3 veces más. La primera de ellas se desechó y las dos últimas, se recogieron los extractos para su posterior análisis. El descarte de la primera fue para comprobar la repetibilidad del método.

Para optimizar el método se procedió a realizar otras pruebas, que se detallarán a continuación.

Según la configuración, entra al cartucho 10 mL de muestra y salen 1.5 mL de extracto. A priori, el factor de concentración sería de $10/1.5 = 6.67$. Los 1.5 mL salen del cartucho en 5 minutos, por lo que cada minuto salen 0.3 mL de eluyente. Cabe la posibilidad de que los analitos salgan en un minuto en concreto y que haya minutos en los que solo salga acetona sola porque aún los analitos no han sido arrastrados.

La forma de investigar este fenómeno fue colectando en viales los extractos a diferentes tiempos.

1. Se recogió el minuto 1. $V_f=0.3$ mL
2. Se recogieron los minutos 1+2. $V_f=0.6$ mL
3. Se recogieron los minutos 1+2+3. $V_f=0.9$ mL
4. Se recogieron los minutos 1+2+3+4. $V_f=1.2$ mL

El quinto minuto no hizo falta recogerlo ni analizarlo porque su valor se puede obtener por diferencia.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Tabla 10. Concentración de los extractos.

Compuesto	Concentración (ng/L)						Alícuota
	R1	R2	1	12	123	1234	
4-tert-octilfenol	19816	30544	507	70	37316	29354	3950
4-nonilfenol-mix	16096	24730	6363	1948	23226	24870	3868
4-n-nonilfenol	4700	6720	907	380	5233	7156	1109
DEHP	75088	57426	15361	8661	4642	10906	8330

En la Tabla 10 se muestran las concentraciones analizadas por el método TD-GC-MS (SBSE). Las dos primeras columnas (R1 y R2), son los extractos colectando los 5 minutos. Las cuatro columnas siguientes, son las concentraciones de los minutos que se detallan y la última columna es la alícuota tomada de la muestra para poder comparar.

Como conocemos la concentración y el volumen, se calculó la masa adsorbida por el cartucho C-18.

Tabla 11. Masa adsorbida por el cartucho durante el experimento.

Compuesto	Masa adsorbida (ng)						Alícuota
	R1	R2	1	12	123	1234	
4-tert-octilfenol	29.7	45.8	0.2	0.0	33.6	35.2	39.5
4-nonilfenol-mix	24.1	37.1	1.9	1.2	20.9	29.8	38.7
4-n-nonilfenol	7.1	10.1	0.3	0.2	4.7	8.6	11.1
DEHP	112.6	86.1	4.6	5.2	4.2	13.1	83.3

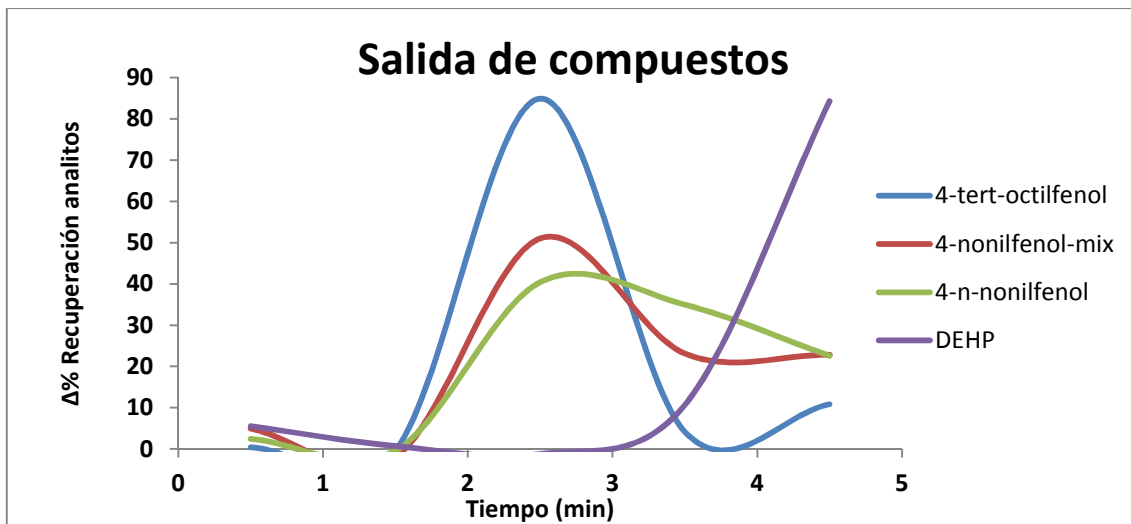
Una vez tenemos la masa adsorbida, por comparación con la alícuota se calculan los porcentajes de compuesto que se recuperan después de quedar fijadas en el cartucho.

Tabla 12. Recuperaciones de los analitos

Compuesto	Recuperaciones %					
	R1	R2	1	12	123	1234
4-tert-octilfenol	75	116	0	0	85	89
4-nonilfenol-mix	62	96	5	3	54	77
4-n-nonilfenol	64	91	2	2	42	77
DEHP	135	103	6	6	5	16

Viendo los resultados, se ve claramente como el 4-tert-octilfenol, 4-nonilfenol-mix, el DEHP y el 4-n-nonilfenol, salen a partir del tercer minuto. Esta información es clave para optimizar el proceso ya que se desecharán los 2 primeros minutos y solo se recogerán los 3 últimos minutos. De esta manera, obtendremos un menor volumen de extracto y éste estará más concentrado.

En el siguiente gráfico se observa claramente el tiempo de salida de los compuestos. Los compuestos salen en el intervalo entre el minuto 2 y el minuto 3, excepto el di (2-etilhexil) ftalato que se desorbe del cartucho durante el último minuto.



Gráfica 1. Salida de los compuestos durante el tiempo de elución.

Una vez definidas las condiciones de trabajo, fue necesaria una repetición de las pruebas con una muestra diferente para comparar los resultados y confirmar que la elección de las condiciones es buena.

9.2 Prueba colectando los 3 últimos minutos

Para que sea válida la repetición, se volvió a preparar otra muestra problema para analizarla. Se tomaron 2 alícuotas. El experimento se repitió 3 veces. Se hicieron pasar por el cartucho de C-18, 10 mL de muestra y se reconstituye en acetona, concentrando así la muestra 11.11 veces. Los 3 extractos, se recogieron en viales. Uno por cada una de las pruebas.

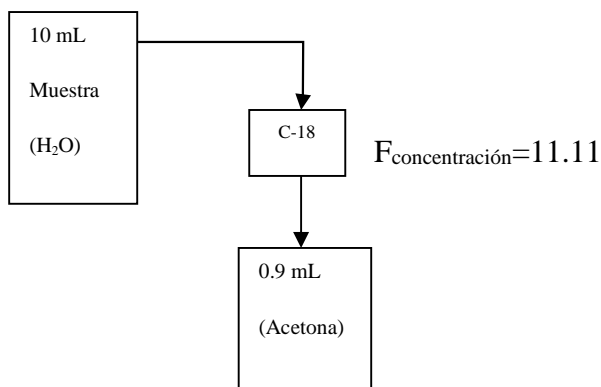


Figura 15. Diagrama de bloques de la prueba experimental.

Nuevamente, se analizaron los extractos y las muestras iniciales para obtener los resultados y con ellos construimos la tabla 13.

Tabla 13. Concentración obtenida mediante el método analítico TD-GC-MS (SBSE).

Compuestos	Concentración (ng/L)					
	Muestra inic. 1	Muestra inic. 2	Muestra promedio	P1	P2	P3
4-tert-octilfenol	4717	3525	4121	41925	39365	32460
4-nonilfenol-mix	2766	1615	2190	24605	24205	20150
4-n-nonilfenol	1197	994	1095	10505	8650	8790
DEHP	13967	10723	12345	100575	122790	96610

En la tabla 13 se muestran las concentraciones reales de las dos alícuotas que se tomaron, para poder tener un valor promedio más fiable. En las 3 últimas columnas se muestran las concentraciones de los extractos de las 3 pruebas independientes realizadas.

El siguiente paso es calcular la masa adsorbida:

Tabla 14. Masa adsorbida por el cartucho C18.

Compuestos	Masa adsorbida (ng)			
	Mpromedio	P21	P22	P23
4-tert-octilfenol	41.2	37.7	35.4	29.2
4-nonilfenol-mix	21.9	22.1	21.8	18.1
4-n-nonilfenol	11.0	9.5	7.8	7.9
DEHP	123.4	90.5	110.5	86.9

Y por último, se calcularon las recuperaciones con la siguiente fórmula:

$$\%Recuperación = \frac{m_{extracto}}{m_{muestra\ inicial}}$$

De esta manera se calculan los porcentajes de recuperación para cada uno de los analitos:

Tabla 15. Recuperaciones de los analitos.

Compuesto	% recuperación			Promedio	%RSD
	P21	P22	P23		
4-tert-octilfenol	92	86	71	83	13
4-nonilfenol-mix	101	99	83	94	11
4-n-nonilfenol	86	71	72	77	11
DEHP	73	90	70	78	13

En la tabla 15, se presentan los resultados obtenidos. El hecho de realizar el experimento descartando los dos primeros minutos dio buenos resultados. Los porcentajes de recuperación se encuentran por encima del 70% y los porcentajes de RSD, por debajo del 15%.

Solo cabe concluir que las pruebas preliminares han sido un éxito porque el cartucho C-18 retiene los analitos de manera exitosa y a la hora de reconstituir el extracto en acetona, ésta arrastra los analitos durante los 3 últimos minutos de los 5 que dura la extracción consiguiendo un factor de concentración de 11.11.

9.3. Determinación del volumen de Ruptura del cartucho C18

Hasta ahora, las pruebas preliminares que se realizaron se hacía pasar por el cartucho 10 mL de muestra preparada en el laboratorio por el cartucho de C-18, pero el objetivo final del FCCU es que sea capaz de captar un mayor volumen de muestra durante el análisis. Por ello, debemos determinar el volumen de ruptura para ver si el cartucho es capaz de pasar 450 mL de muestra a través de él y que los analitos queden retenidos y luego sean reconstituídos en extractos sin problema.

El primer paso fue preparar una disolución madre de concentración 1 µg/L. Se prepararon 500 mL y se preparó para que el equipo tomara muestra.

Se configuró el FCCU para que tomara 450 mL de los analitos a 1 µg/L en H₂O mili-Q, y lo concentre hasta tener un extracto de 0.9 mL en acetona.

Se configuró la CPU y se creó el método con el nombre de FCCU5.

En la siguiente tabla se muestra el método:

Tabla 16. Configuración del método FCCU5 introducido en la CPU para el análisis.

Nº	Duración (min)	Tiempo (min)	Etapas	Paso	V2	V3	V4	B1 Flujo (ml/min)	B1 Disol.	B2 Flujo (ml/min)	B2 Disol.
1	1	0	Preparación	Acondicionamiento	P1	P1	P1	5	MeOH (A)	0	----
2	0.5	1	Preparación	Equilibrado	P1	P1	P1	5	H2O (B)	0	----
3	90	1.5	Muestreo	Muestra	P2	P2	P1	0	----	5	Muestra (B)
4	2.5	91.5	Muestreo	Lavado	P1	P1	P1	1	H2O (B)	0	----
5	2	94	Análisis	Elución desecho	P1	P1	P2	0.3	Acetona (C)	0	----
6	3	96	Análisis	Elución	P1	P2	P2	0.3	Acetona (C)	0	----
8		98	External contact 1: Closed (Pump 2)								
9		99	Final								

El diagrama de bloques se muestra a continuación:

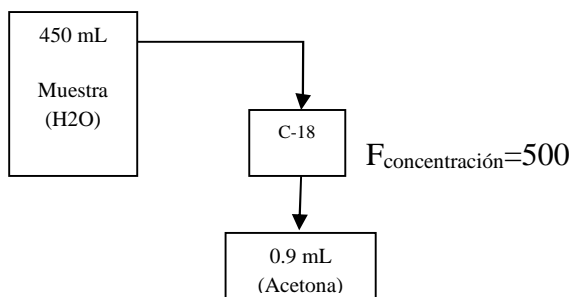


Figura 16. Diagrama de bloques del experimento realizado

Resultados

Se puso en marcha el experimento. Se tomó una alícuota de la muestra inicial y arrancó el equipo hasta obtener el extracto de 0.9 mL en acetona.

El siguiente paso fue analizar mediante la técnica TD-GC-MS (SBSE).

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 17. Concentración de analitos en la muestra y el extracto

Compuestos	Concentración (ng/L)	
	FCCU5	Alícuota muestra
4-tert-octilfenol	312150	383
4-nonilfenol-mix	300810	295
4-n-nonilfenol	92250	153
DEHP	1300200	2025

Efectivamente, los extractos se encuentran a mucha mayor concentración que la muestra inicial.

Ahora calculamos la cantidad de masa adsorbida en el cartucho multiplicando por el volumen:

$$m_{adsorbida} = FCCU5 \cdot 0.0009 L$$

$$m_{adsorbida} = Alícuota\ muestra \cdot 0.45 L$$

Tabla 18. Masa adsorbida por el cartucho

Compuestos	masa adsorbida (ng)	
	FCCU5	M17
4-tert-octilfenol	280.9	172.2
4-nonilfenol-mix	270.7	132.8
4-n-nonilfenol	83.0	68.9
DEHP	1170.2	911.3

Dividiendo ambas masas se obtienen los porcentajes de recuperación:

Tabla 19. Recuperaciones obtenidas por el método FCCU5

Compuestos	% Recuperación
	FCCU5
4-tert-octilfenol	163
4-nonilfenol-mix	204
4-n-nonilfenol	120
DEHP	128

Como se puede comprobar, los resultados no son coherentes con la realidad porque no puede ser que los porcentajes de recuperación salgan por encima del 100%.

Debido a este error, los resultados hubieron de ser repetidos para que tengan validez y poder seguir con el proyecto.

9.4. Repetición de la prueba FCCU5

Por motivo de los malos resultados que dio la anterior prueba, se decidió repetir el experimento con meticuloso cuidado en la preparación de las muestras y la recogida de los extractos así como la posible contaminación con otras muestras.

Se volvió a preparar una muestra inicial a 1 µg/L. El equipo de FCCU se puso de nuevo en marcha con la configuración FCCU5.

Se tomaron 2 alícuotas de la muestra inicial para hacer el promedio y saber la concentración exacta.

Finalmente se analizaron las muestras mediante TD-GC-MS (SBSE) y las concentraciones resultantes se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 20. Recuperaciones del método FCCU5

Compuestos	Recuperaciones (%)	
	FCCU5 1	FCCU5 2
4-n-nonilfenol	94	82
4-tert-octilfenol	77	63
DEHP	71	75
4-nonilfenol-mix	66	72

Tal y como se muestra en la tabla 20tabla, los resultados obtenidos se asemejan mucho a los esperados. Los porcentajes de recuperación se encuentran por encima del 60%.

9.5 Prueba para la determinación del adsorbente adecuado para compuestos farmacéuticos en CFIS

Para la determinación de compuestos farmacéuticos y estrógenos con el dispositivo CFIS, se han realizado distintas pruebas de optimización y adaptación y desarrollo para poder utilizar este dispositivo para el análisis de este tipo de compuestos que se unen a las ya explicadas anteriormente.

Se seleccionaron 4 tipos de sorbentes que por nuestra experiencia podían resultar adecuados para la determinación de compuestos farmacéuticos y estrógenos. Estos sorbentes fueron:

- Oasis HLB Plus Short Cartridge

Cantidad de sorbente: 225 mg

Tamaño de partícula: 60 μm



- C-18

Cantidad de sorbente: 500 mg

Tamaño de partícula: 76.2 μm



- WCX

Cantidad de sorbente: 60 mg

Tamaño de partícula: 30 μm



- MCX.

Cantidad de sorbente: 225 mg

Tamaño de partícula: 6 μm



Los compuestos químicos a analizar son los siguientes fármacos y hormonas:

Fármacos

- Sulfametoxazol
- Carbamazepina
- Roxitromicina
- Eritromicina
- Ciprofloxacino
- Trimetoprim
- Norfloxacino
- Diclofenaco
- Azitromicina
- Sulfatiazol
- Ketoprofeno
- Naproxeno
- Ibuprofeno

Hormonas

- Estrona
- Etinilestradiol
- Estradiol
- Estriol

Los pasos que se siguieron para la validación del CFIS para la determinación de compuestos farmacéuticos fueron los siguientes:

Se cogen 4 cartuchos de HLB, MCX, C-18 y WCX.

Activación de los cartuchos pasando 3 mL de metanol

Pasar por el cartucho 3 mL de H₂O

Se prepara una disolución que contenga un mixto de todos los fármacos que tenemos interés.

Vamos a preparar 250 mL con una concentración de 100 µg/L.

Cada uno de los fármacos se encuentra como disolución hija concentrada a 10 mg/L por lo que según la fórmula,

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$100 \mu \frac{g}{L} \cdot 0.25L = 10mg/L \cdot V_2$$

$$V_2 = 2.5 mL$$

V₂ es el volumen que se pipeteó de cada uno de los compuestos en un matraz aforado de 250 mL

Se pasaron 10 mL del mixto por cada uno de los cartuchos excepto por los blancos que se pasó H₂O mili-Q.

Lavamos pasando 1 mL de H₂O.

Se procedió a la extracción con 4 mL de eluyente pero, para comprobar que eluyente se comportaba mejor, se extrajeron tal y como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 21. Esquema de los diferentes adsorbentes y eluyentes.

Extracción	HLB	(Blanco) MeOH-Acetona 1:1	4 mL
		MeOH	4 mL
		MeOH-Acetona 1:1	4 mL
		Acetona	4 mL
	C-18	(Blanco) MeOH-Acetona 1:1	4 mL
		MeOH	4 mL
		MeOH-Acetona 1:1	4 mL
		Acetona	4 mL
	MCX	(Blanco) MeOH-Acetona 1:1	4 mL
		MeOH	4 mL
		MeOH-Acetona 1:1	4 mL
		Acetona	4 mL
	WCX	(Blanco) MeOH-Acetona 1:1	4 mL
		MeOH	4 mL
		MeOH-Acetona 1:1	4 mL
		Acetona	4 mL

Se analizó tanto el agua inicial como el agua después de pasar por el cartucho con tal de verificar que todos los compuestos habían quedado retenidos.

Los extractos se diluyeron 10 veces para poder pincharlos por inyección directa. Se procedió al análisis mediante la técnica HPLC-MS/MS cuyo detector era un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo. Los procedimientos se detallan en el apartado 4.4.1.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Tabla 22. Recuperaciones compuestos farmacéuticos y estrógenos.

Compuesto	HLB MeOH	HLB MeOH:Acet	HLB Acet	C18 MeOH	C18 MeOH:Acet	C18 Acet	WCX	MCX
Trimetoprim	60	67	58	86	66	5	< 10	< 10
Norfloxacino	134	235	229	13	18	3	< 10	< 10
Sulfatiazol	113	117	117	125	130	130	< 10	< 10
Sulfametoxazol	98	108	103	109	122	119	< 10	< 10
Acritomicina	48	45	37	3	3	3	< 10	< 10
Carbamazepina	105	113	110	111	117	116	< 10	< 10
Eritromicina	86	88	83	19	2	1	< 10	< 10
Ketoprofen	86	99	94	97	107	102	< 10	< 10
Roxitromocina	96	95	85	11	2	2	< 10	< 10
Naproxeno	99	96	87	85	95	93	< 10	< 10
Ibuprofeno	95	97	90	87	93	98	< 10	< 10
Diclofenaco	89	92	91	15	23	11	< 10	< 10
Estrona	87	85	82	84	86	93	< 10	< 10
Etinilestradiol	90	87	89	87	91	87	< 10	< 10
Estradiol	88	91	93	93	91	86	< 10	< 10
Estriol	82	90	87	85	86	92	< 10	< 10

Los resultados obtenidos con los sorbentes WCX y MCX fueron muy pobres puesto que los resultados obtenidos no fueron coherentes y las recuperaciones muy bajas. Por ello se descartaron dichos sorbentes debido al buen comportamiento del HLB y C18.

Observaciones:

Se adaptó el dispositivo CFIS para el análisis de compuestos farmacéuticos y estrógenos obteniendo muy buenos resultados de recuperación y sensibilidad.

Teniendo en cuenta los valores de recuperaciones obtenidos así como las condiciones de análisis del dispositivo CFIS para la determinación de compuestos polares, se decidió como mejor opción para la determinación de compuestos farmacéuticos y estrógenos, la utilización de HLB como sorbente y 4 mL de metanol como proceso óptimo de extracción.

De esta forma el dispositivo CFIS solamente debe incorporar un único cartucho de sorbente para la determinación de éstos grupos de compuestos (compuestos polares,

compuestos farmacéuticos y estrógenos) y solo es necesario un único extracto para el análisis cromatográfico.

De esta forma podemos concluir que el dispositivo CFIS queda perfectamente optimizado para la determinación de compuestos farmacéuticos y estrógenos en aguas, siendo la forma de proceder en los muestreos exactamente la misma que para la determinación de compuestos polares.

En la tabla que se muestra a continuación se resumen las características principales de la metodología:

Tabla 23. Parámetros metodología general para compuestos farmacéuticos y estrógenos

Parámetros metodología	
Sorbente	HLB
Eluyente	4 mL metanol
Caudal paso de muestra	9 mL/min aproximadamente*
Factor de corrección C_w	% recuperación determinado para cada analito
Volumen agua muestreo	2 L*

*Los valores pueden variar en función de la muestra que se vaya a analizar.

9.6 Validación de los métodos

Teniendo en cuenta el objetivo de la tecnología FCCU, el proceso de validación se hizo sobre una matriz de agua dopada a 2 concentraciones diferentes, estos puntos de concentración, se establecieron dependiendo de qué configuración FCCU se iba a validar. Se realizaron 3 validaciones en la siguiente tabla, se pueden ver las principales características de cada proceso de validación.

Tabla 24. Principales características de los procedimientos validados.

Adsorbente	Eluyente	Compuestos validados	Puntos de concentración validados	Autor
HLB	Acetona	Simazina, Atrazina, Diurón and Isoproturón	0.03 µg/L 1 µg/L	Labaqua S.A.
HLB	Dimetilsulfóxido (DMSO)	Diurón and Isoproturón	0.05 µg/L 2 µg/L	Labaqua S.A
C18	Acetona	4-n-nonylphenol, 4-tert-octylphenol 4-nonylphenol mix	0.2 µg/L 0.8 µg/L	Guillermo Serrano

Repetibilidad y reproducibilidad

La determinación de la repetibilidad y la reproducibilidad es una medida de precisión del método. Se entiende por repetibilidad de un método la variación en las medidas tomadas por una sola persona o instrumento bajo las mismas condiciones. Del mismo modo, la reproducibilidad es la capacidad de ser reproducido un experimento en su totalidad, bien por el mismo investigador o por otro trabajador, independientemente. El estudio de la reproducibilidad puede ser enfocado de diferentes maneras: gente diferente, días diferentes, etc.

Con el fin de determinar la repetibilidad del método, se hicieron 5 análisis diferentes el mismo día, la misma persona y en las mismas condiciones. La repetibilidad se calculó con la siguiente ecuación:

$$r = t_{\infty} \sqrt{2} \cdot s_r$$

Para determinar la reproducibilidad del método, se hicieron dos análisis más otro día por otra persona, la ecuación utilizada para calcular este parámetro es:

$$R = t_{\infty} \sqrt{2} \cdot s_R$$

Donde:

t_{∞} = t de Student para $v=$

s_R = desviación estándar de los resultados obtenidos

Determinación de la precisión

Hay muchas maneras para determinar la trazabilidad del método. Se obtuvo el parámetro comparando el valor promedio obtenido de diferentes análisis, es decir, los mismos datos que se usaron para calcular la reproducibilidad, comparando con un valor de referencia. En este caso, mediante análisis de las muestras mediante HPLC-MS/MS.

Gracias a que la muestra fue analizada por HPLC-MS/MS nosotros supimos la concentración real de la muestra. Así como su desviación estándar.

Utilizando la siguiente ecuación, se calculó la trazabilidad del método:

$$\frac{|V_c - V_M|}{\sqrt{\left(\frac{U_{VC}}{K}\right)^2 + \left(W \frac{S_{VM}}{\sqrt{n}}\right)^2}} < 2 \quad (\text{Pr obabilidad } 95\%)$$

Donde,

W = factor

V_c = valor de referencia (muestra analizada mediante HPLC-MS/MS)

V_M = valor promedio obtenido por diferentes análisis y en diferentes condiciones

U_{VC} = incertidumbre del valor de referencia (valor de la concentración obtenida por HPLC · incertidumbre del método HPLC)

SVM es la desviación estándar de los análisis realizados.

K = factor; en este caso el valor es 1

Si el resultado de esta ecuación es inferior a 2, el método utilizado es trazable. En el caso de que el resultado del cociente sea mayor que 2, el método es no trazable y significa que el método no es válido. Cuando el resultado de esta ecuación es mayor a 2, suele ser debido a que existen errores sistemáticos cometidos durante el proceso de análisis, por lo tanto debemos definirlos y solucionarlos.

Determinación de la incertidumbre

La metodología utilizada para determinar la incertidumbre del método fue usando una referencia (muestra de agua analizada mediante HPLC-MS/MS). Con el fin de expresar la incertidumbre en el informe se escogió el valor más alto obtenido; es decir, si se obtuvo el valor más alto de incertidumbre utilizando agua contaminada a una concentración de 2 µg/L, se utilizó este valor para la metodología en general.

Con el fin de calcular la incertidumbre se utilizaron los valores de los análisis utilizados en la determinación de la reproducibilidad. Se conoce la concentración media, la desviación estándar y el número de análisis realizados, además, tenemos información sobre la incertidumbre y concentración real del valor de referencia. Debido a que tenemos que tener en cuenta distintos factores durante el procedimiento analítico, se utiliza la siguiente ecuación para determinar la incertidumbre, ya que, de esta manera, podemos determinar la incertidumbre del método teniendo en cuenta todos los factores que pueden afectar a este parámetro.

$$I = \sqrt{u^2 + \left(w \frac{s}{\sqrt{n}}\right)^2 + \left(\frac{\text{Control}}{\sqrt{3}}\right)^2} \quad u = dC_f (\sim g / L)$$

Donde,

u = incertidumbre del valor de referencia

s = desviación estándar de los diferentes análisis realizados

n = número de análisis realizados

Control = concentración real de la muestra (analizada por HPLC)

En este proceso de validación, no fue necesario determinar este parámetro porque se probó para la concentración mínima que se quiso determinar y no había ningún problema para alcanzar este nivel de concentración, por lo que no fue necesario determinar el límite de detección. Además, se hizo el procedimiento de validación en este nivel de concentración.

9.6.1 Validación de 4-n-nonilfenol, 4-tert-octilfenol y 4-nonilfenol mix utilizando C18 como adsorbente y Acetona como eluyente.

Compuestos: 4-n-nonilfenol, 4-tert-octilfenol y 4-nonilfenol mix

Eluyente: Acetona

Niveles de concentración en la validación: 0.2 y 0.8 µg/L

Nota: durante este método, se pretendió validar también de DEHP (Di(2-etilhexil)ftalato pero surgieron algunos problemas con los blancos y las curvas de calibración por lo que no se pudo realizar la validación de este compuesto.

9.6.1.1 Punto Bajo

- **Repetibilidad**

Tabla 25. Resultados de la repetibilidad

Punto bajo (0.2 µg/L)	Control 15 %		
	4-tert-octilfenol	4-n-nonilfenol	Nonilfenol mix
Valor teórico	0,276	0,220	0,199
Valor obtenido	4-tert-octilfenol	4-n-nonilfenol	Nonilfenol mix
R1	0,255	0,222	0,210
R2	0,188	0,213	0,213
R3	0,198	0,234	0,214
R4	0,257	0,198	0,237
R5	0,201	0,238	0,269
	4-tert-octilfenol	4-n-nonilfenol	Nonilfenol mix
Promedio	0,219	0,221	0,228
Desviación estándar	0,0335	0,0162	0,0250
RSD (%)	15	7	11

- **Reproducibilidad**

Tabla 26. Resultados de la reproducibilidad

	4-tert-octilfenol	4-n-nonilfenol	Nonilfenol mix
Valor teórico	0,276	0,220	0,199
Valor obtenido	4-tert-octilfenol	4-n-nonilfenol	Nonilfenol mix
R1	0,255	0,222	0,210
R2	0,188	0,213	0,213
R3	0,198	0,234	0,214
R4	0,265	0,292	0,269
R5	0,278	0,231	0,189
	4-tert-octilfenol	4-n-nonilfenol	Nonilfenol mix
Promedio	0,237	0,239	0,219
Desviación estándar	0,0411	0,0308	0,0298
RSD (%)	17	13	14

- **Incertidumbre**

Tabla 27. Resultados de la incertidumbre

Compuestos	u	w	s	n	I (mg/L)	I (%)
4-tert-octilfenol	0,044	1,4	0,0411	5	0,056	20
4-n-nonilfenol	0,037	1,4	0,0298	5	0,045	23
Nonilfenol mix	0,036	1,4	0,0308	5	0,045	20

- Trazabilidad

Tabla 28. Resultados de la trazabilidad

	4-tert-octilfenol	4-n-nonilfenol	Nonilfenol mix
Concentración real del material de referencia	0,276	0,220	0,199
Incertidumbre del material de referencia	0,0442	0,0374	0,0358
K	1	1	1

Valores obtenidos	4-tert-octilfenol	4-n-nonilfenol	Nonilfenol mix
	0,255	0,222	0,210
	0,188	0,213	0,213
	0,198	0,234	0,214
	0,265	0,202	0,269
	0,278	0,231	0,209

	4-tert-octilfenol	4-n-nonilfenol	Nonilfenol mix
Promedio	0,237	0,221	0,223
Desviación estándar	0,04113	0,01341	0,02578
W	1,4	1,4	1,4
Cociente	0,7770	0,0191	0,6138

MÉTODO TRAZABLE	MÉTODO TRAZABLE	MÉTODO TRAZABLE
-----------------	-----------------	-----------------

9.6.1.2. Punto Alto

- Repetibilidad

Tabla 29. Resultados de la repetibilidad

Punto alto (0.8 µg/L)	Control 15 %		
	4-tert-octilfenol	4-n-nonilfenol	Nonilfenol mix
Valor teórico	0,853	0,877	0,899
Valor obtenido	4-tert-octilfenol	4-n-nonilfenol	Nonilfenol mix
R1	0,823	0,890	0,989
R2	0,802	0,846	0,857
R3	0,877	0,905	0,855
R4	0,956	0,954	0,961
R5	0,923	0,977	0,982
	4-tert-octilfenol	4-n-nonilfenol	Nonilfenol mix
Promedio	0,877	0,914	0,929
Desviación estándar	0,0649	0,0521	0,0672
RSD (%)	7	6	7

- Reproducibilidad

Tabla 30. Resultados de la reproducibilidad.

	4-tert-octilfenol	4-n-nonilfenol	Nonilfenol mix
Valor teórico	0,853	0,877	0,899
Valor obtenido	4-tert-octilfenol	4-n-nonilfenol	Nonilfenol mix
R1	0,823	0,890	0,989
R2	0,802	0,846	0,857
R3	0,877	0,905	0,855
R4	0,985	0,977	0,967
R5	0,868	0,897	0,945
	4-tert-octilfenol	4-n-nonilfenol	Nonilfenol mix
Promedio	0,871	0,903	0,923
Desviación estándar	0,0705	0,0472	0,0627
RSD (%)	8	5	7

- **Incertidumbre**

Tabla 31. Resultados de la incertidumbre

Compuestos	u	w	s	n	I (mg/L)	I (%)
4-tert-octilfenol	0,137	1,4	0,0705	5	0,161	19
4-n-nonilfenol	0,149	1,4	0,0627	5	0,173	19
Nonilfenol mix	0,162	1,4	0,0472	5	0,181	21

- **Trazabilidad**

Tabla 32. Resultado de la trazabilidad

	4-tert-octilfenol	4-n-nonilfenol	Nonilfenol mix
Concentración real del material de referencia	0,853	0,877	0,899
Incertidumbre del material de referencia	0,1366	0,1490	0,1618
K	1	1	1

Valores obtenidos	4-tert-octilfenol	4-n-nonilfenol	Nonilfenol mix
	0,823	0,890	0,989
	0,802	0,846	0,857
	0,877	0,905	0,855
	0,985	0,977	0,967
	0,868	0,897	0,945

	4-tert-octilfenol	4-n-nonilfenol	Nonilfenol mix
Promedio	0,871	0,903	0,923
Desviación estándar	0,07055	0,04717	0,06268
W	1,4	1,4	1,4
Cociente	0,1241	0,1734	0,1427

MÉTODO TRAZABLE	MÉTODO TRAZABLE	MÉTODO TRAZABLE
-----------------	-----------------	-----------------

9.6.2. RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DEL SISTEMA DE PRE-CONCENTRACIÓN DE MICROCONTAMINANTES

Tras la tarea de desarrollo y optimización del muestreador CFIS para la determinación de compuestos farmacéuticos y estrógenos, es necesaria la etapa de validación del dispositivo con el fin de verificar el perfecto funcionamiento de éste muestreador.

La etapa de validación del dispositivo CFIS tiene como finalidad la determinación de los siguientes parámetros:

- Linealidad
- Repetibilidad
- Reproducibilidad
- Límite de detección
- Incertidumbre
- Exactitud.

A continuación se mostrara el procedimiento de validación para la determinación de compuestos farmacéuticos y estrógenos en aguas residuales hospitalarias y farmacéuticas, mediante dispositivo CFIS.

Rango lineal

El método se demuestra lineal dentro del rango alcanzado por las rectas de calibrado.

Se realizaron distintas pruebas de linealidad del dispositivo de preconcentración con valores desde 0,01 µg/l hasta 100 µg/l. la linealidad del dispositivo se evaluó mediante el coeficiente de regresión. En la Tabla 33 se muestra el coeficiente de regresión para el análisis de los compuestos seleccionados en los distintos rangos evaluados.

Tabla 33. Linealidad del dispositivo con la concentración:

Compuesto	R² en el rango 0.01 -5 µg/L	R² en el rango 0.01 -50 µg/L	R² en el rango 0.01 -100µg/L
Trimetoprim	0.999	0.991	0.9
Acritomicina	0.998	0.992	0.851
Carbamazepina	0.997	0.991	0.912
Ibuprofeno	0.995	0.991	0.915
Diclofenaco	0.998	0.993	0.921
Etinilestradiol	0.997	0.993	0.871

Como se puede observar el para todos los compuestos el rango lineal es aceptable desde 0.01 a 50 µg/L. Sin embargo, para etinilestradiol y azitromicina, la linealidad no es correcta en rangos de concentración superiores a estos valores.

Estudio de la matriz y preparación de las muestras

Para el estudio de los efectos de matriz los ensayos se han realizado tomando aguas procedentes de los puntos de estudio. Posteriormente con los datos experimentales obtenidos se han realizado los cálculos de incertidumbre, repetibilidad y reproducibilidad, a dos niveles de concentración, realizando el tratamiento de los blancos.

Las muestras fueron preparadas a partir de disoluciones concentradas de 1 µg/L y 10 µg/L en metanol de todos los compuestos objeto de estudio, con esta mezcla de compuestos se prepararon los puntos bajos y altos para la realización de la validación.

Repetibilidad y reproducibilidad

Se estudió la repetibilidad y la reproducibilidad a dos niveles de concentración de analitos, uno de concentración baja (0.01 µg/L en agua residual) y otro de concentración alta (10 µg/L en agua residual). Para el cálculo de estos parámetros se han realizado 10 experimentos a cada concentración en muestras reales dopadas.

La repetibilidad nos da el margen de confianza cuando las condiciones humanas, temporales y de infraestructura son iguales. La reproducibilidad nos da el margen de confianza cuando esas condiciones son diferentes, es decir, tenemos medidas analíticas de diferentes días, diferentes analistas, etc.

El cálculo de repetibilidad (r) se realiza mediante la expresión:

$$r = t_{\infty} \sqrt{2} \cdot S_r$$

$$S_r = \sqrt{\frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n(n-1)}}$$

Donde,

S_r = La desviación estándar calculada con valores de medida realizados el mismo día y por el mismo analista.

El cálculo de reproducibilidad (R) es análogo siendo:

S_R = La desviación estándar calculada con valores de medida realizados distintos días y diferentes analistas cuando es posible.

$$R = t_{\infty} \sqrt{2} \cdot S_R$$

El valor de t de Student para ∞ grados de libertad y un nivel de confianza del 95% (t_{∞}) es de 1.96.

Se consideran aceptables las repetibilidades y reproducibilidades cuando la Sr es superior a 0.95.

Calculo de la incertidumbre

Para determinar la incertidumbre se desglosa el cálculo en varias partes, se calcula la incertidumbre de cada una de las partes y las combina para obtener la incertidumbre global del proceso de medida químico. Para poder sumar los distintos componentes, estos han de estar expresados como varianzas.

Esta aproximación está basada en estimar la incertidumbre total mediante identificación, estimación y combinación de todas las fuentes de incertidumbre asociadas con el proceso de medida.

Se han considerado las siguientes fuentes de incertidumbre para el procedimiento de análisis:

- A. Incertidumbre del patrón y las diluciones
- B. Incertidumbre de repetición
- C. Incertidumbre de control

Los resultados obtenidos de incertidumbre para K=2 están indicados en la Tabla 434

Límite de cuantificación.

Los límites de cuantificación han sido calculados a partir de la relación señal ruido del análisis del punto bajo en la validación. En todos los casos, mediante el sistema de preconcentración, se obtiene un límite de detección cercano a 1 ng/L en la Tabla 34 se resumen los datos de validación para los compuestos seleccionados. Estos datos demuestran que el dispositivo de preconcentración permite el análisis de estos compuestos de una forma robusta y con unos límites de cuantificación muy bajos.

Tabla 34. Datos obtenidos de la validación:

Compuesto	Reproducibilidad (RSD %)	Repetibilidad (RSD %)	Límite de Cuantificación (ng/L)	Incertidumbre para k=2 (%)	Linealidad (rango µg/L)
Trimetoprim	11	12	0.7	31	0.01-50
Acritomicina	12	14	0.5	30	0.01-50
Carbamazepina	12	13	0.3	33	0.01-50
Ibuprofeno	13	13	0.7	34	0.01-50
Diclofenaco	14	15	0.8	31	0.01-50
Etinilestradiol	15	17	2.2	35	0.01-50

9.7 Análisis de muestras reales mediante el método FCCU

Con el objetivo de probar el funcionamiento de FCCU, el laboratorio Labaqua S.A. recibió unas muestras reales de la depuradora de Sant Feliu (Barcelona).

Las 24 muestras fueron tomadas a la salida de la estación depuradora de aguas residuales cada 6 horas. El muestreo comenzó el día 10 de marzo de 2013 a las 12 de la mañana. Fueron embotelladas en envases de vidrio de topacio de 1 litro.

A continuación se pondrá a prueba con muestras reales, el equipo para ver el funcionamiento del proceso que hemos optimizado y validado.

De cada muestra se dispone de un litro. Se extrajeron 400 mL para realizar la extracción con el cartucho de HLB y otros 400 mL para realizar la extracción con el cartucho de C-18. Los 200 mL restantes se guardaron como medida de seguridad para posibles complicaciones como que hubiera que repetir el experimento.

Las muestras venían cargadas con sólidos en suspensión por lo que hubo que realizar previamente un filtrado con papel de filtro del laboratorio.

El FCCU está configurado para recoger 450 mL de muestra por lo que a los 400 extraídos de la botella, se le añadieron 100 mL de H₂O. Luego, se tuvo que tener en cuenta el factor de dilución para los cálculos posteriores.

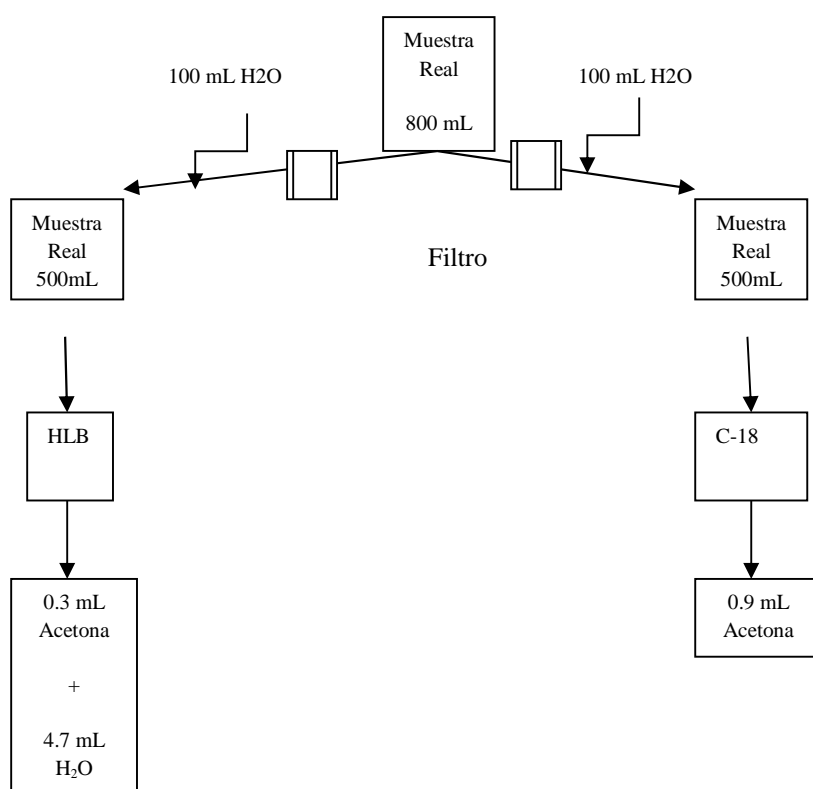


Figura 17. Diagrama de bloques del proceso con muestra real

9.7.1 Cartucho HLB

Una vez puesto a punto el equipo, los resultados de FCCU con el cartucho HLB y con muestra de depuradora real, se muestran a continuación:

Tabla 35. Resultados de los pesticidas mediante el método FCCU

Muestra	Simazina	Atrazina	Isoproturón	Diurón
Data File	Final Conc.	Final Conc.	Final Conc.	Final Conc.
Lunes 10-M 12 h	< 0.1	0.05	< 0.1	0.08
Lunes 10-M 12 h extracto	0.0033	0.0027	0.0029	0.0082
Lunes 10-M 18 h	< 0.1	0.06	< 0.1	0.07
Lunes 10-M 18 h extracto	0.0026	0.0027	0.0030	0.0065
Martes 11-M 0h	< 0.1	0.06	< 0.1	0.07
Martes 11-M 0h extracto	0.0024	0.0028	0.0027	0.0073
Martes 11-M 6h	< 0.1	0.06	< 0.1	0.07
Martes 11-M 6h extracto	0.0022	0.0027	0.0025	0.0062
Martes 11-M 12h	< 0.1	0.05	< 0.1	0.07
Martes 11-M 12h extracto	0.0019	0.0025	0.0025	0.0062
Martes 11-M 18h	< 0.1	0.06	< 0.1	0.07
Martes 11-M 18h extracto	0.0012	0.0025	0.0025	0.0061
Miércoles 12-M 0h	< 0.1	0.06	< 0.1	0.07
Miércoles 12-M 0h extracto	0.0012	0.0025	0.0024	0.0069
Miércoles 12-M 6h	< 0.1	0.06	< 0.1	0.07
Miércoles 12-M 6h extracto	0.0012	0.0023	0.0028	0.0062
Jueves 13-M 12h	< 0.1	< 0.1	< 0.1	0.06
Jueves 13-M 12h extracto	< 0.1	0.0018	0.0027	0.0065
Jueves 13-M 18h	< 0.1	< 0.1	< 0.1	0.06
Jueves 13-M 18h extracto	< 0.1	0.0016	0.0022	0.0054
Viernes 13-M 0h	< 0.1	0.04	< 0.1	0.08
Viernes 13-M 0h extracto	< 0.1	0.0017	0.0025	0.0068
Viernes 13-M 6h	< 0.1	< 0.1	< 0.1	0.06
Viernes 13-M 6h extracto	0.0009	0.0016	0.0021	0.0061

Muestra	Simazina	Atrazina	Isoproturón	Diurón
Data File	Final Conc.	Final Conc.	Final Conc.	Final Conc.
Lunes 31-M 12h	0.120	0.041	< 0.1	0.074
Lunes 31-M 12h extracto	0.015	0.002	0.002	0.007
Lunes 31-M 18h	0.10	< 0.1	< 0.1	0.07
Lunes 31-M 18h extracto	0.017	0.002	0.002	0.009
Martes 1-A 0h	0.09	< 0.1	< 0.1	0.06
Martes 1-A 0h extracto	0.014	0.001	0.002	0.008
Martes 1-A 6h	0.12	< 0.1	< 0.1	0.07
Martes 1-A 6h extracto	0.011	0.002	0.002	0.009
Martes 1-A 12h	0.13	< 0.1	< 0.1	0.09
Martes 1-A 12h extracto	0.016	0.001	0.002	0.007
Martes 1-A 18h	0.13	< 0.1	< 0.1	0.07
Martes 1-A 18h extracto	0.008	0.002	0.002	0.009
Miércoles 2-A 0h	0.14	< 0.1	< 0.1	0.07
Miércoles 2-A 0h extracto	0.007	0.002	0.002	0.008
Miércoles 2-A 6h	< 0.1	< 0.1	< 0.1	0.08
Miércoles 2-A 6h extracto	0.005	0.002	0.002	0.009
Jueves 3-A 12h	0.10	< 0.1	< 0.1	0.08
Jueves 3-A 12h extracto	0.006	0.002	0.002	0.008
Jueves 3-A 18h	< 0.1	< 0.1	< 0.1	0.08
Jueves 3-A 18h extracto	0.006	0.002	0.002	0.009
Viernes 4-A 0h	0.08	< 0.1	< 0.1	0.07
Viernes 4-A 0h extracto	0.006	0.001	0.002	0.009
Viernes 4-A 6h	< 0.1	< 0.1	< 0.1	0.07
Viernes 4-A 6h extracto	0.006	0.001	0.001	0.009

9.7.2 Cartucho C18

En cuanto a los resultados obtenidos con el cartucho de concentración C18, lamentablemente no pudo realizarse la prueba con agua residual real procedente de la depuradora de Sant Feliu.

El sistema FCCU tiene incorporado un sistema de seguridad que en el momento en el que se alcanza una presión de 400 bares, el sistema de control reconoce la sobrepresión y salta el error y se paraliza el experimento.

Esto ocurrió a partir del tercer análisis en el que no se pudo continuar debido a que el agua de muestra, contenía demasiados sólidos en suspensión, que a pesar de realizar un filtrado previo, el cartucho alcanzaba la obturación y era incapaz de pasar tanto volumen de muestra.

Por este motivo no se pudieron realizar análisis ni obtener datos de muestra real procedente de EDAR con este cartucho de concentración.

10. Conclusiones

Todos los valores de incertidumbre se encuentran en torno a valores admisibles (20-40%), estos resultados son comunes en este tipo de metodologías ya que la cantidad de factores que pueden afectar a los resultados finales es alta.

En la siguiente tabla podemos ver la incertidumbre obtenida en cada metodología en el proceso de validación.

Tabla 36. Incertidumbre obtenida en el proceso de validación por Labaqua S.A.

Compuestos	U (%)
Utilizando HLB con Acetona	
Atrazina	30
Simazina	40
Diurón	29
Isoproturón	36
Utilizando HLB con DMSO	
Diurón	32
Isoproturón	31
Utilizando C18 con Acetona	
4-n-nonilfenol	23
4-tert-octilfenol	20
4-nonilfenol mix	21

Se obtuvo una buena repetibilidad y reproducibilidad (RDS inferior al 15%) en la validación del FCCU con C18

En lo referente al límite de detección, la FCCU permite obtener un factor de concentración superior a 100 veces y permite mejorar el LOD final de acuerdo con el DMA europea, sin embargo, Sin embargo finalmente dependerá del tipo de detector utilizado en el prototipo final.

Teniendo en cuenta todos los parámetros estadísticos obtenidos en la validación, las metodologías desarrolladas utilizando el módulo de la unidad de FCCU son capaces de determinar contaminantes, en la matriz de aguas residuales con la certeza de que los resultados obtenidos son fiables.

No pudo ser posible la realización de los experimentos referentes al cartucho C18 con muestras de agua reales procedente de depuradora debido a que el cartucho se obturaba y se producían errores por sobrepresión. Por otro lado, los resultados con el cartucho de HLB fueron exitosos y ofrecía resultados coherentes y exitosos.

Los métodos de validación de análisis de fármacos y estrógenos, ofrecen muy buenos resultados con valores de incertidumbre entre 30 y 35 %

En general, se obtienen límites de cuantificación considerablemente aceptables.

La configuración del dispositivo CFIS utilizará cartuchos de HLB y metanol como eluyente como proceso óptimo. Pudiendo analizar de esta forma, todos los analitos deseados.

El equipo FCCU permite obtener un factor de concentración superior a 100 veces porque permite mejorar el límite de detección de acuerdo con la DMA. Aunque dependerá de los progresos futuros con el detector de microalgas.

Se ha realizado la validación del método para el análisis de fármacos y estronas mediante el preconcentrador CFIS obteniéndose muy buenos resultados de reproducibilidad, repetibilidad e incertidumbre. La incertidumbre, en todos los casos, está entre valores del 30-35 %, lo que es perfectamente aceptable dado todo el proceso que sufre la muestra en el análisis. Los límites de cuantificación que se alcanzan están cercanos a 1 ng/L. La linealidad obtenida por estos métodos está comprendida entre 0.01 y 50 µg/L.

11. Bibliografía.

- Ahel, M.; Giger, W.; Schaffner, C.; *Water Research*, **1994**, 26, 1143.
- Aparicio, I.; Santos, J.L.; Alonso, E.; *Waste Management*, **2009**, 29, 1747.
- Barceló, D.; *Trends in Analytical Chemistry*, **2003**, 22, xiv.
- Barceló, D.; Petrovic, M.; *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2006**, 385, 983.
- Bartolomé, L.; Cortazar, E.; Raposo, J.C.; Usobiaga, A.; Zuloaga, O.; Etxebarria, N.; Fernández, L.A.; *Journal of Chromatography A*, **2005**, 1068, 229.
- Bokern, M.; Harms, H.H.; *Environmental Science and Technology*, **1997**, 31, 1849.
- Carson, R.L.; *Silent Spring*, **1962**, Houghton Mifflin, Boston.
- Clara, M.; Scharf, S.; Scheffknecht, C.; Gans, O.; *Water Research*, **2007**, 41, 4339.
- Colborn, T.; Dumanoski, D.; Myersen, P.; *Our Stolen Future*, **1996**, Penguin Books, New York.
- Dachs, J.; Van Ry, D.A.; Eisenreich, S.J.; *Environmental Science and Technology*, **1999**, 33, 2676.
- Düring, R-A.; Krabe, S.; Gäth, S.; *Environmental Science and Technology*, **2002**, 36, 4052.
- Eljarrat, E.; Barceló, D.; *Trends in Analytical Chemistry*, **2003**, 22, 655.
- Estrategia comunitaria en Materia de alteradores endocrinos. Comisión de la Comunidades Europeas, Bruselas, **1999**.
- Estrategia comunitaria en materia de alteradores endocrinos. Comisión de la Comunidades Europeas, Bruselas, **2007**.
http://ec.europa.eu/environment/endocrine/documents/sec_2007_1635_en.pdf.
- González, S.; Petrovic, M.; Barceló, D.; *Journal of Chromatography A*, **2004**, 1052, 111.
- Jacobsen, A.M.; Mortensen, G.K.; Hansen, C.B.; *Journal of Environmental Quality*, **2004**, 33, 232.
- John, D.; Alan House, W.; White, G.F.; *Environmental Toxicology and Chemistry*, **2000**, 19, 293.
- León, V.M.; Llorca-Porcel, J.; Álvarez, B.; Cobollo, M.A.; Muñoz, S.; Valor, I. “Analysis of 35 priority semivolatile compounds in water by stir bar Sorptive extraction–thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry Part II: Method validation”. *Analytica Chimica Acta*, **2006**, 558, 261-266.
- León, V.M.; Álvarez, B.; Cobollo, M.A.; Muñoz, S.; Valor, I. “Analysis of 35 priority semivolatile compounds in water by stir bar Sorptive extraction–thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry Part II: Method validation”, *J. Chromatogr.*, **2003**, 999, 91–101.
- León, V.M.; Álvarez, B.; Cobollo, M.A.; Muñoz, S.; Valor, I. “Analysis of 35 priority semivolatile compounds in water by stir bar Sorptive extraction–thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry Part II: Method validation”, *Analytica Chimica Acta*, **2006**, 558, 261–266.

- Llorca-Porcel, J.; Martínez-Sánchez, G.; Álvarez, B.; Cobollo, M.A.; Valor, I., “Analysis of nine polybrominated diphenyl ethers in water samples by means of stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography–mass spectrometry”, *Analytica Chimica Acta* **2006**, 569, 113–118.
- Mueller, G.C.; Kim, U-H.; *Endocrinology*, **1978**, 102, 1429.
- Núñez, L.; Tadeo, J.L.; Turiel, E.; *Nuevas metodologías para la determinación de nonilfenol, sus derivados etoxilados y parabenos en muestras medioambientales*, **2010**.
- Petersen, S.O.; Henriksen, K.; Mortensen, G.K.; Krogh, P.H.; Brandt, K.K.; Sørensen, J.; Madsen, T.; Petersen, J.; Grøn, C.; *Soil & Tillage Research*, **2003**, 72, 139.
- Petrovic, M.; Barceló, D.; *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2006**, 385, 422.
- Petrovic, M.; Díaz, A.; Ventura, F.; Barceló, D.; *Analytical Chemistry*, **2001**, 73, 5886.
- Petrovic, M.; Eljarrat, E.; De Alda, M.J.L.; *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2004**, 378, 549.
- Pombo, M.; Castro, L.; Disruptores Endocrinos, Universidad de Santiago de Compostela. <http://www.asquifyde.org/wpcontent/uploads/2009/07/disruptores-endocrinos-m-pombo-y-m-castro.pdf>.
- Pryor, S.W.; Hay, A.G.; Walter, L.P.; *Environmental Science and Technology*, **2002**, 36, 3678.
- Recchia, A.G.; Vivacqua, A.; Gabriele, S.; Carpino, A.; Fasanella, G.; Rago, V.; Bonofiglio, D.; Maggiolini, *Food Additives and Contaminants*, **2004**, 21, 134.
- Richardson, S.D.; *Analytical Chemistry*, **2009**, 81, 4645.
- Rudel, R.A.; Perovich, L.J.; *Atmospheric Environment*, **2009**, 43, 170.
- Sanjuán Tortosa, L., “Optimización de un sistema de medida en continuo (cfis) para la determinación de contaminantes orgánicos de origen polar en aguas”, **2011**.
- Soto, A.M.; Justicia, H.; Wray, J.W.; Sonnenschein, C.; *Environmental Health Perspectives*, **1991**, 92, 167.
- Sumpter, J.P.; *Toxicology Letters*, **1998**, 337, 102.
- Vázquez-Duhalt, R.; Maquez-Rocha, F.; Ponce, E.; Licea, A.F.; Viana, M.T.; *Applied Ecology and Environmental Research*, **2005**, 4, 1.
- Warhurst, M.A.; *An Environmental Assessment of Alkylphenol Ethoxylates and Alkylphenols*.**1995**.
- http://www.foe.co.uk/resource/reports/ethoxylates_alkylphenols.pdf.
- <http://www.i-ambiente.es/?q=blogs/proyecto-life-aquatik-deteccion-automatizada-de-contaminantes-prioritarios-en-aguas>
- www.life-aquatik.eu
- Widarto, T.; Holmstrup, M.; Forbes, V.E.; *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **2004**, 58, 147.