

# Universidad de Huelva

Departamento de Química y Ciencia de los Materiales



## Desarrollo de métodos basados en el uso de membranas para la determinación de microcontaminantes orgánicos en alimentos, medio ambiente y fluidos biológicos

Memoria para optar al grado de doctor  
presentada por:

**José Manuel Manso Sayago**

Fecha de lectura: 26 de diciembre de 2013

Bajo la dirección de los doctores:

Tamara García Barrera  
José Luis Gómez Ariza

**Huelva, 2013**





Universidad  
de Huelva

**TESIS DOCTORAL**

**DESARROLLO DE MÉTODOS BASADOS EN EL USO DE MEMBRANAS  
PARA LA DETERMINACIÓN DE MICROCONTAMINANTES  
ORGANICOS EN ALIMENTOS,  
MEDIO AMBIENTE Y FLUIDOS BIOLÓGICOS**

**dqcm**

Departamento de química  
y ciencia de los Materiales  
PROFESOR JOSÉ CARLOS VILCHEZ MARTÍN

**AMB**

Análisis  
Medioambiental  
Bioanálisis

**JOSÉ MANUEL MANSO SAYAGO**

**HUELVA, 2013**



**UNIVERSIDAD DE HUELVA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA Y CIENCIA DE LOS MATERIALES**  
**“PROFESOR JOSÉ CARLOS VÍLCHEZ MARTÍN”**



**Universidad  
de Huelva**

---

**DESARROLLO DE MÉTODOS BASADOS EN EL USO DE  
MEMBRANAS PARA LA DETERMINACIÓN DE  
MICROCONTAMINANTES ORGANICOS EN ALIMENTOS,  
MEDIO AMBIENTE Y FLUIDOS BIOLÓGICOS**

---

**PROGRAMA DE DOCTORADO:  
TÉCNICAS INSTRUMENTALES EN QUÍMICA**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
POR:**

**José Manuel Manso Sayago**

**DIRECTORES:**

**Dra. Tamara García Barrera**

**Dr. José Luis Gómez Ariza**

**Huelva, 2013**



# **DESARROLLO DE MÉTODOS BASADOS EN EL USO DE MEMBRANAS PARA LA DETERMINACIÓN DE MICROCONTAMINANTES ORGANICOS EN ALIMENTOS, MEDIO AMBIENTE Y FLUIDOS BIOLÓGICOS**

D. JOSÉ LUIS GÓMEZ ARIZA, Catedrático de Universidad y Director del Departamento de Química y Ciencia de los Materiales “Profesor José Carlos Vilchez Martín” de la Universidad de Huelva

HACE CONSTAR QUE:

El presente trabajo de investigación, titulado “Desarrollo de métodos basados en el uso de membranas para la determinación de microcontaminantes orgánicos en alimentos, medio ambiente y fluidos biológicos”, realizado por D. José Manuel Manso Sayago, bajo la dirección de los profesores Tamara García Barrera y José Luis Gómez Ariza, reúne los requisitos necesarios para ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral en el Departamento de Química y Ciencia de los Materiales “Prof. J. C. Vilchez Martín” de la Universidad de Huelva.

Huelva, 26 de Noviembre de 2013

Fdo. José Luis Gómez Ariza



**DESARROLLO DE MÉTODOS BASADOS EN EL USO DE  
MEMBRANAS PARA LA DETERMINACIÓN DE  
MICROCONTAMINANTES ORGANICOS EN ALIMENTOS,  
MEDIO AMBIENTE Y FLUIDOS BIOLÓGICOS**

DIRECTORES:

Fdo. Tamara García Barrera  
Prof. Titular de Universidad

Fdo. José Luis Gómez Ariza  
Catedrático de Universidad

**UNIVERSIDAD DE HUELVA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA Y CIENCIA DE LOS MATERIALES**

**“PROFESOR JOSÉ CARLOS VÍLCHEZ MARTÍN”**



**Universidad  
de Huelva**

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
POR:

Fdo. José Manuel Manso Sayago  
Licenciado en Ciencias Químicas



## *Agradecimientos*

---

Deseo hacer constar mi más sincero agradecimiento a las personas que me han ayudado durante la elaboración de esta Tesis:

En primer lugar, quisiera agradecer a Tamara García Barrera y José Luís Gómez Ariza, directores de la presente memoria, por prestarme su ayuda mucho más allá de lo profesional. Para el desarrollo de esta Tesis ha sido fundamental su esfuerzo, sus conocimientos y orientaciones, y sobre todo, la motivación que han sabido transmitirme durante el tiempo que he trabajado a su lado.

En segundo lugar, quisiera agradecer a todos mis compañeros del laboratorio el haberme soportado tantas horas de trabajo y haberme apoyado en todo momento para que pudiera sacar lo mejor de mí y me superara a mí mismo.

También quisiera dar las gracias, de corazón, a mi familia porque su ilusión por ver terminado este trabajo me dio alas en los peores momentos para no desfallecer y seguir luchando.

Por último, quisiera agradecer a Merche, mi novia, su cariño y apoyo incondicional, porque no me permitió rendirme cuando todo parecía en contra.

A todos, muchísimas gracias.



# *Índice general*

---



<b>Índice de Figuras</b> .....	VII
<b>Índice de Tablas</b> .....	XI
<b>Lista de acrónimos</b> .....	XV
<b>Resumen</b> .....	1
<b>Summary</b> .....	5
<b>Objetivos y justificación de la Tesis Doctoral</b> .....	7
<b>Objectives and justification of the Doctoral Thesis</b> .....	11
<b>Introducción</b> .....	13
1. La preparación de la muestra en la determinación de microcontaminantes orgánicos persistentes en alimentos, medio ambiente y fluidos biológicos.....	16
2. Técnicas de extracción basadas en el uso de membranas.....	25
2.1. Teoría y principios de la extracción con membranas líquidas.....	25
2.2. Dispositivos y configuraciones.....	35
2.3. Ventajas y aplicaciones del uso de membranas.....	37
3. Microcontaminantes orgánicos de interés ambiental.....	43
3.1. Plaguicidas organoclorados.....	43
3.2. Bifenilos policlorados (PCBs).....	45
3.3. Difeníleteres polibromados (PBDEs).....	48
3.4. Hidrocarburos halogenados.....	51
3.5. Fármacos y sus productos de degradación.....	53
Referencias.....	55
<b>Capítulo 1. Desarrollo de una nueva metodología para la determinación de contaminantes orgánicos persistentes en muestras biológicas y de alimentos</b> .....	69
1. Introducción.....	72
2. Materiales y métodos.....	74

## Índice general

---

2.1.	Disoluciones, reactivos y muestras.....	74
2.2.	Procedimiento de extracción.....	75
2.3.	Análisis cromatográfico.....	76
2.4.	Diseño experimental y análisis estadístico de datos.....	77
3.	Discusión y resultados.....	78
3.1.	Desarrollo de un nuevo acoplamiento para la microextracción en fase líquida.....	78
3.2.	Optimización de la separación cromatográfica y detección de masas.....	78
3.3.	Optimización univariante de la microextracción en fase líquida.....	79
3.3.1.	Optimización del tipo de disolvente.....	81
3.3.2.	Optimización de la velocidad de agitación.....	81
3.3.3.	Optimización de la cantidad de disolvente orgánico modificador....	82
3.3.4.	Optimización del ajuste de la fuerza iónica.....	83
3.4.	Optimización multivariante de la microextracción en fase líquida.....	85
3.5.	Validación del método.....	90
3.6.	Aplicación a muestras reales.....	91
4.	Conclusiones.....	91
	Referencias.....	99
	<b>Anexo 1.</b> “New home made assembly for hollow-fibre membrane extraction of persistent organic pollutants from real world samples” .....	101
	<b>Capítulo 2.</b> A multiple hollow fibre-liquid phase microextraction method for the determination of halogenated solvent residues in edible oils.....	115
1.	Introduction.....	118
2.	Experimental.....	119
2.1.	Standard solutions, reagents and samples.....	119
2.2.	Instrumentation.....	120
2.3.	Multiple Hollow Fibre-Liquid phase microextraction.....	121

## *Índice general*

---

3. Results and discussion.....	122
3.1. Optimization of the HF-LPME method.....	122
3.1.1. Choice of extraction solvent.....	123
3.1.2. Extraction time.....	123
3.1.3. Stirring speed.....	124
3.1.4. Ionic strength.....	124
3.1.5. Temperature, pH and membrane length.....	125
3.2. Performance of the method.....	125
3.3. Application to real samples.....	128
4. Conclusions.....	128
References.....	129
<b>Capítulo 3. Determinación de 4-isobutilacetofenona y otros productos de degradación de NSAIDs en aguas residuales y lodos de depuradoras.....</b>	<b>131</b>
1. Introducción.....	135
2. Materiales y métodos.....	137
2.1. Disoluciones, reactivos y muestras.....	137
2.2. Procedimiento de extracción.....	138
2.3. Optimización de la separación cromatográfica y detección de masas.....	139
3. Discusión y resultados.....	141
3.1. Optimización de la microextracción en fase líquida.....	141
3.1.1. Optimización del tipo de disolvente.....	141
3.1.2. Optimización del tiempo de extracción.....	142
3.1.3. Optimización de la velocidad de agitación.....	143
3.1.4. Optimización de la longitud de la membrana de fibra hueca.....	144
3.1.5. Optimización del ajuste de la fuerza iónica.....	144
3.1.6. Optimización de la temperatura y el pH de la muestra.....	145

## *Índice general*

---

3.2. Validación del método.....	146
3.3. Aplicación a muestras reales.....	147
4. Conclusiones.....	150
Referencias.....	151
<b>Anexo 2.</b> “Determination of 4 <sup>l</sup> -isobutylacetophenone and other transformation products of non-steroidal anti-inflammatory drugs in water and sludge from five wastewater treatment plants in Sweden” .....	153
<b>Conclusiones generales de la Tesis</b> .....	177
<b>Conclusions</b> .....	181

## *Índice de figuras*

---



<b>Figura 1.</b> Tiempo empleado en el proceso analítico.....	16
<b>Figura 2.</b> Etapas generales en una extracción mediante MSPD.....	21
<b>Figura 3.</b> Procedimiento de extracción con QuEChERS.....	22
<b>Figura 4.</b> Dispositivo de extracción en flujo continuo mediante membrana líquida.....	26
<b>Figura 5.</b> Esquema de funcionamiento de un sistema de extracción con membrana líquida en tres fases.....	27
<b>Figura 6.</b> Perfil de extracción del analito a la fase aceptora en función del tiempo.....	31
<b>Figura 7.</b> Esquema de funcionamiento de un sistema de extracción con membrana líquida en dos fases.....	34
<b>Figura 8 (a).</b> Representación esquemática de la configuración de la membrana en forma longitudinal acoplada a una microjeringa.....	36
<b>Figura 8 (b).</b> Representación esquemática de la configuración de la membrana en forma de U .....	36
<b>Figura 9.</b> Representación esquemática de la extracción con membrana en la modalidad SBME.....	37
<b>Figura 10.</b> Estructura general de los bifenilos policlorados (PCBs).....	46
<b>Figura 11.</b> Estructura general de los difeniléteres polibromados (PBDEs).....	49
<b>Figura 12.</b> Diseño compuesto central para tres factores.....	73
<b>Figura 13.</b> Esquema de la disposición de la membrana para la extracción y una punta de micropipeta GELoader de 20 $\mu\text{L}$ .....	77
<b>Figura 14.</b> Cromatograma obtenido por inyección directa de los cuarenta COPs en concentración 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ .....	79
<b>Figura 15.</b> Efecto del tipo de disolvente en el área relativa de plaguicidas, PCBs y PBDEs..	82
<b>Figura 16.</b> Efecto de la velocidad de agitación de la muestra en el área relativa de plaguicidas, PCBs y PBDEs.....	83

## Índice de figuras

---

<b>Figura 17.</b> Efecto de la adición de acetonitrilo como disolvente modificador a la muestra en el área relativa de plaguicidas, PCBs y PBDEs .....	84
<b>Figura 18.</b> Efecto de la adición de metanol como disolvente modificador a la muestra en el área relativa de plaguicidas, PCBs y PBDEs .....	84
<b>Figura 19.</b> Superficies COMB en 3D que representan la respuesta combinada frente a las variables optimizadas.....	89
<b>Figura 20.</b> Gráficos de contorno que muestran el punto óptimo para las variables optimizadas.....	90
<b>Figura 21.</b> Procedimiento de extracción con el sistema HF-LPME y una punta de micropipeta GELoader de 20 $\mu$ L .....	122
<b>Figura 22.</b> Efecto del tipo de disolvente en el área de pico de los disolventes halogenados.....	123
<b>Figura 23.</b> Efecto del tiempo de extracción en el área de pico de los disolventes halogenados .....	124
<b>Figura 24.</b> Efecto de la velocidad de agitación en el área de pico de los disolventes halogenados .....	125
<b>Figura 25.</b> Cromatograma obtenido mediante la extracción de disolventes halogenados en aceite de oliva fortificado a 10 mg kg <sup>-1</sup> mediante MHF-LPME.....	126
<b>Figura 26.</b> Cromatograma obtenido por inyección en GC-(SIM)-MS del extracto de la extracción de un aceite de oliva enriquecido con 10 mg kg <sup>-1</sup> de cada analito.....	128
<b>Figura 27.</b> Esquema de la disposición de la membrana para la extracción de productos de degradación de NSAIDs en la modalidad de dos fases.....	139
<b>Figura 28.</b> Efecto del tipo de disolvente en el área de pico de los productos de degradación de NSAIDs .....	142
<b>Figura 29.</b> Efecto del tiempo de extracción en el área de pico relativa de los productos de degradación de NSAIDs en agua Milli-Q y agua residual. ....	143
<b>Figura 30.</b> Efecto de la velocidad de agitación en el área de pico de los productos de degradación de NSAIDs.....	144
<b>Figura 31.</b> Efecto de la longitud de la membrana en el área de pico de los productos de degradación de NSAIDs .....	145

## *Índice de tablas*

---



<b>Tabla 1.</b> Aplicaciones de las técnicas analíticas de extracción basadas en el uso de membranas.....	39
<b>Tabla 2.</b> Nomenclatura y propiedades físico-químicas de los PCBs.....	46
<b>Tabla 3.</b> Nomenclatura y propiedades físico-químicas de los PBDEs.....	50
<b>Tabla 4.</b> Propiedades físico-químicas de algunos NSAIDs.....	54
<b>Tabla 5.</b> Parámetros instrumentales del espectrómetro de masas.....	80
<b>Tabla 6.</b> Matriz del diseño experimental del RCCD.....	86
<b>Tabla 7.</b> Respuestas (áreas de pico) para los plaguicidas, PCBs and PBDEs obtenidas por HF-LPME en los experimentos del RCCD.....	87
<b>Tabla 8.</b> Modelos reducidos representando la relación entre las variables y las respuestas de plaguicidas, PCBs and PBDEs.....	93
<b>Tabla 9.</b> Parámetros de calidad del método de extracción para plaguicidas, PCBs y PBDEs.....	95
<b>Tabla 10.</b> Recuperaciones relativas para los analitos extraídos en las muestras de zumo de naranja, tomate triturado y plasma de sangre animal.....	96
<b>Tabla 11.</b> Parámetros de calidad del método de extracción HF-LPME y MHF-LPME de disolventes halogenados. Valores de recuperaciones para los analitos extraídos en muestras de aceite de oliva fortificado.....	127
<b>Tabla 12.</b> Propiedades e iones característicos de los productos de degradación de los NSAIDs.....	140
<b>Tabla 13.</b> Parámetros de calidad del método de extracción HF-LPME para los productos de degradación de NSAIDs.....	147
<b>Tabla 14.</b> Concentración de los productos de degradación de NSAIDs estudiados en agua influente de plantas de tratamiento de aguas residuales en el sur de Suecia.....	149
<b>Tabla 15.</b> Concentración de diclofenaco amida en agua bio-influente, bio-efluente y lodos de la planta de aguas residuales de Ellinge.....	149



## *Lista de acrónimos*

---



## *Listado de acrónimos*

---

<b>3-AcBP</b>	3-Aceobenzophenone	3-Acetobenzofenona
<b>4-IBAP</b>	4-Isobutylacetophenone	4-Isobutilacetofenona
<b>4-BAP</b>	4-Butylacetophenone	4-Butilacetofenona
<b>BPA</b>	-	Buenas prácticas agrícolas
<b>CA</b>	-	California
<b>CAS</b>	Conventional Activated Sludge Treatment	Tratamiento convencional de lodos activados
<b>CCD</b>	Central Composite Design	Diseño compuesto central
<b>CE</b>	Capillary Electrophoresis	Electroforesis capilar
<b>CFC</b>	ChloroFluoroCarbon	Clorofluorocarbono
<b>COMB</b>	-	Respuesta combinada
<b>COP/ POP</b>	Persistent Organic Pollutant	Compuesto orgánico persistente
<b>COX</b>	-	Ciclooxigenasa
<b>DDD</b>	Dichlorodiphenyldichloroethane	Diclorodifenildicloroetano
<b>DDE</b>	Dichlorodiphenyldichloroethylene	Diclorodifenildicloroetileno
<b>DDT</b>	Dichlorodiphenyltrichloroethane	Diclorodifeniltricloroetano
<b>DE</b>	Delaware	-
<b>DFC</b>	Diclofenac	Diclofenaco
<b>DLLME</b>	Dispersive Liquid–Liquid Microextraction	Extracción líquido-líquido dispersiva
<b>d-SPE</b>	Dispersive-Solid Phase Extraction	Extracción en fase sólida dispersiva
<b>E</b>	Effectiveness	Eficiencia de la extracción LPME

## *Listado de acrónimos*

---

<b>ECD</b>	Electron Capture Detector	Detector de captura electrónica
<b>EEA</b>	European Environment Agency	Agencia europea para la protección del medio ambiente
<b>E<sub>f</sub></b>	Effectiveness Factor	Factor de eficacia
<b>EI</b>	Electronic Impact	Impacto electrónico
<b>EPA</b>	Environmental Protection Agency	Agencia de protección ambiental de los Estados Unidos
<b>EU/UE</b>	European Union	Unión Europea
<b>FAO</b>	Food and Agriculture Organization of the United Nations	Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura
<b>FISQ</b>	-	Foro intergubernamental sobre seguridad química
<b>GC</b>	Gas Chromatography	Cromatografía de gases
<b>HCH</b>	Hexachlorocyclohexane	Hexaclorociclohexano
<b>HF</b>	Hollow Fibre	Membrana de fibra hueca
<b>HPLC</b>	High Pressure Liquid Chromatography	Cromatografía líquida de alta eficacia
<b>IARC</b>	International Agency for Research on Cancer	Agencia internacional para la investigación del cáncer
<b>IBP</b>	Ibuprofen	Ibuprofeno
<b>IOC</b>	International Olive Council	Consejo oleícola internacional
<b>IUPAC</b>	International Union of Pure and Applied Chemistry	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
<b>KTP</b>	Ketoprofen	Ketoprofeno
<b>LC</b>	Liquid Chromatography	Cromatografía líquida
<b>LLE</b>	Liquid-Liquid Extraction	Extracción líquido-líquido
<b>LOD</b>	Limit of Detection	Límite de detección

## *Listado de acrónimos*

---

<b>LOQ</b>	Limit of Quantification	Límite de cuantificación
<b>LPME</b>	Liquid-Phase Microextraction	Microextracción en fase líquida
<b>MAE</b>	Microwave Assisted Extraction	Extracción asistida por microondas
<b>MHF-LPME</b>	Multi Hollow Fibre Liquid-Phase Microextraction	Microextracción en fase líquida múltiple
<b>MRL</b>	Maximum Residue Limit	Límite máximo de residuos
<b>MS</b>	Mass Spectrometry	Espectrometría de masas
<b>MSPD</b>	Matrix Solid Phase Dispersion	Dispersión de la matriz en fase sólida
<b>NSAID</b>	Non-steroidal anti-inflammatory drug	Droga anti-inflamatoria no esteroidea
<b>OK</b>	Oklahoma	-
<b>PBDE</b>	Polydiphenylether	Difeniléter polibromado
<b>PCB</b>	Polychlorobiphenyl	Policloro bifenilo
<b>PCDD</b>	Polychlorinated dibenzodioxin	Policlorodibenzodioxina
<b>PCDF</b>	Polychlorinated dibenzofuran	Policlorodibenzofurano
<b>PE</b>	Population Equivalent	“Habitante equivalente”
<b>PLE</b>	Pressurised Liquid Extraction	Extracción con líquidos presurizados
<b>UNEP/PNUMA</b>	United Nations Environment Programme	Programa de las Naciones Unidas para la protección del medio ambiente
<b>POPRC</b>	Persistent Organic Pollutants Review Committee	Comité de evaluación de los contaminantes orgánicos persistentes
<b>PP</b>	Polypropylene	Polipropileno
<b>PSA</b>	Primary Secondary Amine	Amina primaria-secundaria
<b>PSU</b>	Polysulfone	Polisulfona

## *Listado de acrónimos*

---

<b>PTFE</b>	Polytetrafluoroethylene	Politetrafluoroetileno
<b>PVDF</b>	Polyvinylidene fluoride	Fluoruro de polivinilideno
<b>QuEChER</b>	Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe	“rápido, fácil, económico, eficaz, robusto y seguro”
<b>RCCD</b>	Rotable Central Composite Design	Diseño compuesto central “girable”
<b>RSD</b>	Relative Standard Deviation	Desviación estándar relativa
<b>SBME</b>	Solvent Bar Microextraction	Microextracción con barra de disolvente
<b>SDME</b>	Solvent Drop Microextraction	Microextracción en forma de gota
<b>SFE</b>	Supercritical fluid Extraction	Extracción con fluidos supercríticos
<b>SME</b>	Solvent Microextraction	Microextracción con disolvente
<b>SPE</b>	Solid Phase Extraction	Extracción en fase sólida
<b>SPME</b>	Solid Phase Microextraction	Microextracción en fase sólida
<b>UAE</b>	Ultrasound Assisted Extraction	Extracción asistida por ultrasonidos
<b>UN/ONU</b>	United Nation	Organización de las naciones unidas
<b>WHO</b>	World Health Organization	Organización mundial de la salud
<b>WWTP</b>	Wastewater Treatment Plant	Planta de tratamiento de aguas residuales

*Resumen*

---



### **Resumen**

Los alimentos constituyen una importante interfase entre el medio ambiente y la salud, pudiendo producirse efectos en la salud humana derivados de la presencia de sustancias tóxicas originadas por la contaminación del medio ambiente. La presente Tesis se centra en el desarrollo de métodos analíticos y su aplicación al estudio de alimentos que pudieran contener compuestos tóxicos originados como consecuencia de la actividad humana, pero aplicables también a muestras biológicas, para la biomonitorización de los mismos. Por otra parte, también se ha evaluado la presencia de contaminantes emergentes en el medio ambiente, mediante la aplicación de estas metodologías a la determinación de fármacos y sus productos de degradación en aguas residuales.

Los métodos analíticos que se han desarrollado en esta Tesis se basan en el uso de membranas poliméricas porosas (HF-LPME), una de las técnicas más utilizadas en la actualidad debido a las ventajas que presenta, que pueden resumirse en una elevada reproducibilidad, ausencia de contaminación cruzada entre muestras (debido a que las membranas son de un solo uso), altos factores de enriquecimiento, rapidez, bajo coste, aplicabilidad a diferentes tipos de analitos, tolerancia a un amplio rango de pH y facilidad para la automatización y su conversión en técnica verde. Esta técnica analítica se ha combinado con métodos quimiométricos que han permitido optimizar las variables para alcanzar unas condiciones instrumentales de gran aplicabilidad, de forma que estos métodos pueden utilizarse para la extracción de compuestos diferentes a los considerados en esta Tesis. Asimismo, se ha desarrollado una estrategia basado en la extracción múltiple mediante HF-LPME que ha permitido mejorar la sensibilidad y evitar el efecto matriz, lo cual representa un problema importante en el análisis de muestras de alimentos y biológicas. El acoplamiento de la cromatografía de gases con detectores de espectrometría de masas orgánicas y de captura de electrones, ha permitido mejorar considerablemente los límites de detección a la vez que una identificación inequívoca de los analitos. Las metodologías analíticas son simples, precisas y de bajo coste, por lo que pueden ser transferibles a los laboratorios de rutina relacionados con el control de calidad de alimentos, medio ambiente o la salud.

Los métodos analíticos desarrollados se han aplicado a la determinación de compuestos orgánicos persistentes como plaguicidas, bifenilos policlorados y difenil éteres polibromados en muestras de zumo, verduras, y plasma sanguíneo; disolventes halogenados en aceite de oliva, y fármacos y sus productos de

## *Resumen*

---

degradación en aguas residuales, lo cual pone de manifiesto el carácter integrado de esta Tesis.

### **Summary**

Food is an important interface between environment and health, and some health problems have their origin in the presence of toxic compounds in food, as a consequence of environmental pollution. This Thesis is focused on the development of analytical methods and their application to food analysis in search of toxic substances that can be present as a consequence of human activities, but also applicable to their biomotorization. On the other hand, the evaluation of emergent pollutants has also been carried out through the application of these methodologies to the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs and their degradation products in wastewater and sludge.

The analytical methods developed in this Thesis are based on the use of porous polymeric membranes (HF-LPME), which actually is one of the most used techniques due to the numerous advantages, namely: reproducibility, absence of sample carryover (due to the disposable nature of the membranes), high analyte enrichments, high throughput, low cost, applicability to many different types of analytes, large pH tolerance range and facility for automation and conversion into greener analytical techniques. This analytical technique has been combined with chemometric methods which allow optimizing variables to get instrumental conditions of great applicability to different compounds than those considered in this Thesis. Moreover, an analytical strategy based on the multiple stepwise extractions using HF-LPME has been developed which enhance sensitivity and overcome simple matrix problems which is crucial in complex samples like food and biological fluids. The instrumental coupling of gas chromatography with both electron capture detector and organic mass spectrometry enhances considerably the detection limits as well as unequivocal identification of the analytes is allowed. On the other hand, since the analytical methods proposed in this Thesis are simple, reproducible and cheap, they can be used in routine laboratories related with food control analysis, environmental monitoring or health.

The analytical methods have been applied to the determination of pesticides, polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in juice, vegetables and blood plasma; halogenated solvents in olive oil, and non-steroidal anti-inflammatory drugs in wastewaters and sludge, demonstrating the integrated character of this Thesis.



*Objetivos*

---



### **Objetivos y justificación de la Tesis Doctoral**

El objetivo general de esta Tesis ha sido el desarrollo de métodos analíticos para la determinación de compuestos orgánicos volátiles en muestras medioambientales, biológicas y de alimentos. El trabajo se ha centrado principalmente en la optimización de nuevas metodologías sensibles y selectivas para la determinación de los analitos en muestras de agua, plasma de origen animal, zumo de naranja, tomate, aceite de oliva, aguas residuales y lodo de depuradora. La principal finalidad ha sido desarrollar nuevos métodos de análisis, rápidos, sencillos, baratos y respetuosos con el medio ambiente.

El crecimiento exponencial de la población y la pretensión constante del aumento de la calidad de vida ha provocado la necesidad de la síntesis y uso extensivo de sustancias y compuestos químicos de diversa naturaleza. En la búsqueda de la mayor efectividad en su función y el menor coste en su producción no se realizan estudios profundos sobre posibles “efectos secundarios” sobre el entorno y, por tanto, estas sustancias químicas en su gran mayoría, son perjudiciales para el medio ambiente y los seres vivos. Este hecho ha obligado a las autoridades internacionales (UN, WHO, FAO, EEA o EPA) a establecer listas de compuestos posiblemente peligrosos y/o peligrosos basándose en los estudios científicos que se han ido realizando con los años. Un ejemplo de ello es el Convenio de Estocolmo, en el que se encuadran sustancias tan peligrosas como el DDT, el lindano, endosulfan, los bifenilos policlorados o los difeniléteres polibromados. Asimismo, los gobiernos de los países deben establecer normativas restrictivas en cuanto a la presencia y exposición a estos contaminantes químicos para asegurar la seguridad de los ciudadanos y la conservación del medio ambiente. Por tanto, el desarrollo de investigaciones científicas que suministren la información necesaria para la correspondiente toma de decisiones sobre qué tipo de compuestos y qué cantidad de los mismos son tóxicos o perjudiciales para el ser humano o la naturaleza, resulta imprescindible.

En la búsqueda de esa información precisa y tan necesaria, se ha realizado en esta Tesis un estudio sobre métodos analíticos para la determinación de compuestos orgánicos volátiles con implicaciones para la salud humana, la mayoría de ellos ya introducidos en el Convenio de Estocolmo, así como de algunos compuestos denominados “contaminantes emergentes”, que suscitan, en la actualidad, un gran interés en la comunidad científica.

## *Objetivos*

---

El estudio analítico realizado se ha centrado en la aplicabilidad de las membranas poliméricas porosas para la extracción de compuestos orgánicos volátiles en muestras de diversa naturaleza. Se han diseñado y optimizado métodos concretos de análisis que ponen de manifiesto las enormes ventajas del uso de este tipo de membranas en los procesos de tratamiento de muestra.

Teniendo en cuenta lo mencionado, los objetivos específicos del trabajo que aquí se desarrolla han sido:

1. El diseño y la optimización de un método para la determinación de plaguicidas, PCBs y PBDEs en muestras de agua, plasma de sangre de cerdo, tomate y zumo de naranja mediante microextracción en fase líquida en la modalidad de dos fases, separación con cromatografía de gases y detección mediante espectrometría de masas y detector de captura de electrones.

2. El desarrollo de un método analítico para la determinación de disolventes halogenados de elevada toxicidad como el tricloroetileno en muestras de alimentos de gran importancia social y económica como el aceite de oliva. Aplicación de una multi-microextracción con membranas porosas para solucionar habituales provocados por la matriz en las muestras de aceite.

3. Desarrollo, optimización y validación de una metodología analítica para la determinación de contaminantes emergentes como algunos productos de degradación de fármacos de uso extensivo como el ibuprofeno o el diclofenac, mediante microextracción en fase líquida y detección por cromatografía de gases-espectrometría de masas.

### **Objectives and justification of the Doctoral Thesis**

The overall objective of this Thesis has been the development of analytical methods for the determination of volatile organic compounds in environmental, biological and food samples. This work has focused on the optimization of new sensitive and selective methods for the determination of analytes in water samples, animal blood plasma, juice, tomato, olive oil, wastewater and sewage sludge. The main purpose was to develop new analytical methods, rapid, simple, inexpensive and environmentally friendly.

The exponential growth of the population and the constant aim of increasing the quality of life imply the synthesis and extensive use of chemicals of different nature. In the search of greater effectiveness in their role and lower production cost the main efforts have not been performed in connection with environment, and they are considered as "side effects", therefore, the majority of these chemicals, are harmful to the environment and living beings. This fact has forced the international authorities (UN, WHO, FAO, EEA or EPA) to establish lists of compounds potentially dangerous and/or hazardous based on scientific studies that have been done over the years. An example of this is the Stockholm Convention, which is framed as dangerous substances such as DDT, lindane, endosulfan, polychlorinated biphenyls or polybrominated diphenyl ethers. Furthermore, the governments of the countries should establish stringent regulations regarding the occurrence and exposure to these chemical contaminants to ensure the safety of citizens and environmental conservation. Therefore, scientific research is needed to provide the necessary information to adopt appropriate decisions about the compounds present and toxic or harmful to humans or environment.

This Thesis has been developed in the context of the search of that accurate and valuable information and provides a study about analytical methods for the determination of volatile organic compounds targets on the Stockholm Convention and other compounds called "emerging contaminants" that currently arise, great interest in the scientific community.

The analysis has focused on the applicability of the porous polymeric membrane for the extraction of volatile organic compounds from several samples. An specific analysis methods has been designed and optimized, that show the great advantages of using this type of membrane in sample treatment processes.

Considering the above exposed arguments, the specific objectives of this work developed here were:

## *Objetivos*

---

1. The design and optimization of a method for the determination of some pesticides, PCBs and PBDEs in water, pork blood plasma, orange juice and tomato samples by liquid-phase-microextraction in two-phase mode, and detection by gas chromatography coupled mass spectrometry and electron capture detector.

2. The development of an analytical method for the determination of highly toxic halogenated solvents such as trichloroethylene in food samples high social and economic significance as olive oil. The application of a multi-microextraction with porous membranes that overcome the usual problems caused by the matrix in the oil samples.

3. Development, optimization and validation of an analytical method for the determination of emerging contaminants such as some degradation products of important drugs such as ibuprofen or diclofenac, by liquid-phase-microextraction and detection by gas chromatography-mass spectrometry.

# *Introducción*

---



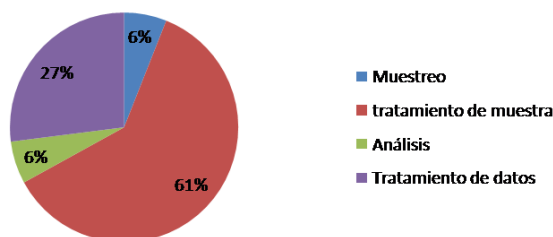
### **Introducción**

Los problemas relacionados con el medio ambiente, los alimentos y la salud se estudian en la actualidad desde numerosos puntos de vista, siendo numerosas las áreas de conocimiento que aportan respuestas y soluciones. Tal es el caso de la toxicología, medicina, biología, geología, física y la química, entre otras ciencias. La Química Analítica es una ciencia metrológica y metodológica, que desarrolla, optimiza y aplica una gran variedad de herramientas, las cuales se materializan en procesos analíticos encaminados a obtener información (bio)química parcial (presencia, estructura y/o concentración de analitos) o global de calidad sobre materias o sistemas de amplia naturaleza (química, bioquímica y biológica) para resolver problemas analíticos [1]. Por tanto, un problema científico-técnico y económico-social se traduce en un problema analítico que se estudia y se materializa en un proceso analítico, el cual debe suministrar la información necesaria para resolver el problema planteado. Así, el proceso analítico debe ser la materialización de la estrategia analítica surgida del planteamiento del problema analítico. En general, incluye una serie de etapas sucesivas que podrían resumirse en toma de muestra, tratamiento de muestra, medición analítica y tratamiento de los datos obtenidos. Todas estas etapas son de crucial importancia para la calidad de los resultados analíticos, por lo que hay que asegurarse de que se lleven a cabo de la manera más eficiente posible, además de con el menor coste de tiempo, material y dinero.

La etapa de la preparación de la muestra es una de las etapas más importante y crítica en el proceso analítico global. De hecho, son escasos los problemas analíticos que se resuelven sin necesidad de un tratamiento adecuado de la muestra antes de proceder a la medida instrumental. Lo habitual es que la muestra necesite algún tipo de tratamiento con el objetivo de preparar la forma y el tamaño de la misma, para modificar la forma química y/o concentración del analito o los analitos en función de la técnica analítica seleccionada y/o para eliminar posibles interferentes de la matriz de la muestra que, o bien atenúan la señal del analito, o producen una señal que es indistinguible de la del analito. El tratamiento de la muestra puede llegar a ser un conjunto complejo de etapas, generalmente, con un gran consumo de tiempo de análisis y manipulaciones, que inevitablemente repercuten en diferente grado en el error analítico en la medida [Figura 1] [2]. Además, el proceso completo de tratamiento de muestra debe asegurar que la muestra mantiene las características físicas y químicas que la hacen representativa del objeto de estudio o problema analítico. Por estos motivos, en las últimas décadas se ha producido una rápida evolución y un crecimiento exponencial del número y calidad de las técnicas

utilizadas para el tratamiento de muestras. Así, se han mejorado y optimizado operaciones tan básicas como la homogeneización, filtración, centrifugación o evaporación y se han desarrollado técnicas analíticas tan importantes como la extracción en fase sólida (SPE), microextracción en fase sólida (SPME), extracción con fluidos supercríticos (SFE), electroforesis capilar (CE), extracción asistida por microondas (MAE) o la extracción con líquidos presurizados (PLE). Sin embargo, todavía es preciso llevar a cabo una investigación más intensa en el número y calidad de las técnicas analíticas destinadas al tratamiento de la muestra que dé lugar a un proceso analítico rápido, seguro, barato, transferible a los laboratorios de rutina, y que aporte información analítica de mayor calidad.

### Tiempo empleado en el proceso analítico



LC/GC Magazine 2002

**Figura 1.** Tiempo empleado en el proceso analítico.

#### **1. *La preparación de la muestra en la determinación de microcontaminantes orgánicos persistentes en alimentos medio ambiente y fluidos biológicos***

La definición de microcontaminante es compleja y existen varias acepciones, pero de forma muy breve se podría definir como: sustancia orgánica, que debido a su toxicidad, persistencia y bioacumulación puede inducir un efecto negativo en los seres vivos o el medio ambiente. Se trata de sustancias naturales o sintéticas, muchas de ellas altamente bioactivas, que se encuentran a niveles de concentración muy bajos (del orden de los  $\mu\text{g L}^{-1}$  o los  $\text{ng L}^{-1}$ ) en todo tipo de muestras. Sin embargo, a pesar de encontrarse en pequeñas cantidades, sus particulares propiedades físicas y químicas, derivadas de su conformación estructural, favorecen

que, una vez liberados al medio, permanezcan inalterados en él durante largos periodos de tiempo resistentes a la exposición a los procesos naturales y se distribuyan en los distintos compartimentos ambientales. Este hecho, unido a su carácter frecuentemente apolar, favorece su acumulación en los tejidos adiposos de los organismos vivos, en los que experimentan procesos de bioconcentración y biomagnificación. De acuerdo al Convenio de Estocolmo [3], la persistencia de estos compuestos se determina mediante la evidencia de la vida media del producto químico en agua por más de dos meses o la vida media en tierra o sedimentos por más de seis meses. Por otra parte, tienen potencial para transportarse a larga distancia, pudiendo llegar a regiones en las que nunca se han producido o utilizado. Estos compuestos orgánicos son, en su mayoría, volátiles en el rango de temperaturas de las latitudes medias. Transportados por la atmósfera, se condensan y depositan en las zonas frías a gran altura o en las latitudes altas. Por su persistencia, pueden ser depositados y volver a volatilizarse en ciclos sucesivos en función de las temperaturas ambientales, produciéndose el efecto conocido como “saltamontes” [3]. El origen de estos compuestos proviene de muy diversas y numerosas fuentes de las que se pueden destacar las prácticas agropecuarias (uso de plaguicidas, fertilizantes, etc...), los residuos de origen urbano y vertederos de residuos sólidos (productos farmacéuticos, higiene y cuidado personal,..) o las actividades del sector industrial, en el que se utilizan un gran número de compuestos orgánicos (disolventes, desengrasantes, pigmentos, conservantes, agentes de limpieza, etc.). Por su carácter tóxico, los microcontaminantes orgánicos están ligados a una serie de efectos nocivos a la salud humana, como trastornos congénitos, daño al sistema inmunológico y respiratorio, problemas reproductivos, desórdenes de índole sexual, periodos de lactación humana más cortos y mal funcionamiento endocrino. Otros síntomas de la exposición nociva a estos compuestos sobre la salud humana incluyen alergias, hipersensibilidad, daño al sistema nervioso, desórdenes neurológicos de comportamiento y desarrollo, pérdida de la corta memoria y cáncer [4].

Teniendo en cuenta que estos compuestos orgánicos persistentes (COPs) plantean peligros importantes, y cada vez mayores en la salud humana y el medio ambiente, en 1995, el Consejo de Administración del Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA), pidió que se iniciara un proceso de evaluación de una lista inicial de 12 COPs y que el Foro Intergubernamental sobre Seguridad Química (FISQ), elaborara recomendaciones respecto de la adopción de medidas a nivel internacional, incluido un instrumento internacional jurídicamente vinculante. Así, el Convenio de Estocolmo es un tratado internacional que tiene

como finalidad proteger la salud humana y el medio ambiente frente a los Contaminantes Orgánicos Persistentes, fijando para ello medidas que permitan eliminar, y cuando esto no sea posible, reducir las emisiones y las descargas de estos contaminantes [3]. El Convenio de Estocolmo incluye un procedimiento de actualización de los anexos en los que se incluyen los Contaminantes Orgánicos Persistentes para los que deben adoptarse medidas concretas. El proceso, incluye una propuesta formal de inclusión por una de las partes firmantes del convenio y que es evaluada por el Comité de Examen de los Contaminantes Orgánicos Persistentes (POPRC) de acuerdo con los criterios del Anexo D. Si el Comité estima la propuesta, se abre un proceso de consultas para elaborar el Perfil de Riesgos y la Evaluación de la Gestión de Riesgos, que servirán de apoyo a la decisión que debe tomar la Conferencia de las Partes [5].

Aunque en un principio sólo se incluyeron un total de 12 compuestos en el convenio de Estocolmo, con el paso de los años se ha ido aumentando el número de COPs presentes en la legislación incluyéndose en él para su restricción y/o eliminación compuestos y familias de compuestos como plaguicidas muy importantes a nivel mundial como el 1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)-etano (DDT), endosulfan o hexaclorobenceno, bifenilos policlorados (PCBs), policlorodibenzodioxinas (PCDDs), policlorodibenzofuranos (PCDFs) o polibromodifenil éteres (PBDEs).

Para la evaluación del riesgo y la toma de decisiones sobre la eliminación y/o reducción de la producción y consumo de estos compuestos es necesaria una amplia gama de procedimientos analíticos que proporcionen la información necesaria para ello. Existen en la actualidad innumerables procesos analíticos para la determinación de compuestos orgánicos persistentes mediante el análisis de todo tipo de muestras. Sin embargo, los bajos niveles de concentración en que se encuentran unido a la complejidad de muchas de las matrices a estudiar, han contribuido en gran medida a que buena parte de las metodologías convencionales de preparación de muestra empleadas para la determinación de estos compuestos sean procedimientos tediosos, que involucran un elevado consumo de reactivos y una manipulación constante de los extractos, con el consiguiente riesgo de contaminación y pérdida de los analitos. Por tanto, para hacer posible un continuo seguimiento de la presencia de estos compuestos en las muestras de interés se requiere el desarrollo de nuevos métodos de tratamiento de muestras que, cumpliendo los requisitos de calidad exigidos para estas determinaciones, sean más rápidos, fiables y respetuosos con el medio ambiente.

En las últimas décadas se han innovado y desarrollado diferentes técnicas y procedimientos para el tratamiento de muestras medioambientales, biológicas y de alimentos. En el caso de muestras sólidas, la extracción convencional utilizando un aparato Soxhlet sigue siendo ampliamente utilizada [6, 7]. Sin embargo, la extracción Soxhlet requiere volúmenes de disolventes extractantes relativamente grandes y, normalmente, la extracción de analitos requiere horas o incluso días en completarse. Además, precisa etapas posteriores de preconcentración y/o limpieza.

La extracción asistida por ultrasonidos (UAE) puede ser una alternativa al tratamiento Soxhlet en el análisis de muestras sólidas [8-11]. Haciendo uso de ultrasonidos de alta energía mediante baños, sondas y reactores, la muestra sólida se dispersa en partículas finas en el seno del disolvente de extracción. Ello conduce a un aumento de la superficie de la muestra en contacto con el disolvente y de este modo se facilita la extracción. En la mayoría de los casos, la extracción puede ser completada en cuestión de minutos. El uso de un menor volumen de disolvente es una de las ventajas más importantes, ya que representa un bajo coste económico y medioambiental del análisis. Como desventajas presenta la escasa focalización de la energía de ultrasonidos (especialmente en los baños) y el difícil control de la temperatura en la muestra que puede provocar pérdidas o descomposición de los analitos.

Otro tipo de energía, más específica, para incrementar la eficiencia de las extracciones de compuestos orgánicos en muestras sólidas es la energía de microondas (MAE). En principio, solamente las muestras o disolventes que contengan moléculas con capacidad para formar dipolos, pueden ser extraídas con este tipo de energía. No obstante, puesto que el agua posee estructura dipolar, la extracción asistida por microondas puede ser utilizada para la determinación de una gran variedad de analitos en un amplio rango de matrices [12-16].

La extracción con líquidos presurizados (PLE) permite también en muchos casos mejorar la eficiencia de extracción [17-23]. En esta técnica, se utilizan disolventes líquidos convencionales (orgánicos o acuosos) a presiones (10-14 MPa) y temperaturas (50-200°C) elevadas. Con la PLE, una pequeña porción de la muestra sólida se coloca en un recipiente de acero inoxidable, en el que se introduce posteriormente el disolvente de extracción, el cual es calentado. Con este sistema se aprovecha el aumento de la solubilidad del analito a temperaturas superiores a los puntos de ebullición de los disolventes extractantes comúnmente utilizados. A las temperaturas más altas usadas en la PLE, los procesos cinéticos para la desorción de los analitos de la matriz son acelerados en comparación con las condiciones de

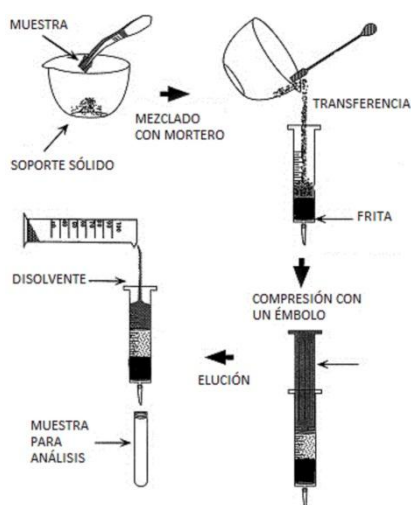
extracción tradicionales. Las principales ventajas de la PLE son el ahorro de energía en el calentamiento, en comparación con la técnica Soxhlet, por ejemplo, la reducción del consumo de disolvente, como resultado de la mayor solubilidad de los analitos, así como una reducción muy importante en el tiempo de análisis

Para la extracción los contaminantes orgánicos persistentes no polares en matrices sólidas se puede utilizar la extracción con fluidos supercríticos (SFE) [23-26]. Ofrece un procedimiento de extracción más verde y efectivo mediante el uso de gases no tóxicos, con una alta pureza y un bajo coste (por ejemplo, dióxido de carbono) como “disolvente” en lugar de disolventes orgánicos. El estado de fluido supercrítico se produce mediante la manipulación de la temperatura y la presión del gas, de modo que éste se encuentre por encima del estado crítico, es decir, en un estado entre el gas y el líquido. Al igual que en PLE, la muestra se coloca en un recipiente de extracción y se presuriza con dióxido de carbono, u otro fluido supercrítico, para extraer los analitos. El contenido se transfiere a un colector de fracciones y se despresuriza, permitiendo de este modo que el dióxido de carbono pase a estado gaseoso y se separe de la muestra. Los analitos extraídos en SFE son entonces atrapados por adsorbentes (por ejemplo, C18) y posteriormente desorbidos para ser analizados. La principal limitación de esta técnica analítica es que no es adecuada para extraer cuantitativamente analitos orgánicos de naturaleza polar. No obstante, es posible añadir disolventes orgánicos modificadores (por ejemplo metanol) para elevar la polaridad del “disolvente de extracción”, aunque ello disminuye bastante las ventajas de esta técnica de extracción.

Para el tratamiento de muestras líquidas viscosas y (semi) sólidas el uso de la extracción con dispersión de la matriz de la muestra en fase sólida (MSPD) representa en la mayoría de los casos una buena alternativa [27-29]. En la MSPD, la extracción y la limpieza de los analitos (clean-up) se lleva a cabo en una sola etapa y haciendo uso de una columna. Esta configuración en columna contribuye a simplificar el proceso de análisis y evita los problemas de emulsión asociados con la mayoría de los procedimientos convencionales basados en LLE. Los parámetros clave que controlan la eficiencia del proceso de MSPD son el agente dispersante y el disolvente de elución para la extracción. Cuando se seleccionan correctamente, la MSPD puede producir extractos listos para analizar, en la mayoría de los casos, mediante GC o LC. El procedimiento, representado en la Figura 2, consiste básicamente en la homogeneización de la muestra y el mezclado con el agente dispersante, transferencia a una columna vacía o empaquetada con algún agente adsorbente para realizar el clean-up, compresión de la mezcla en el interior de la

columna con un émbolo y, finalmente, la elución con el disolvente adecuado para la extracción selectiva de los analitos de interés.

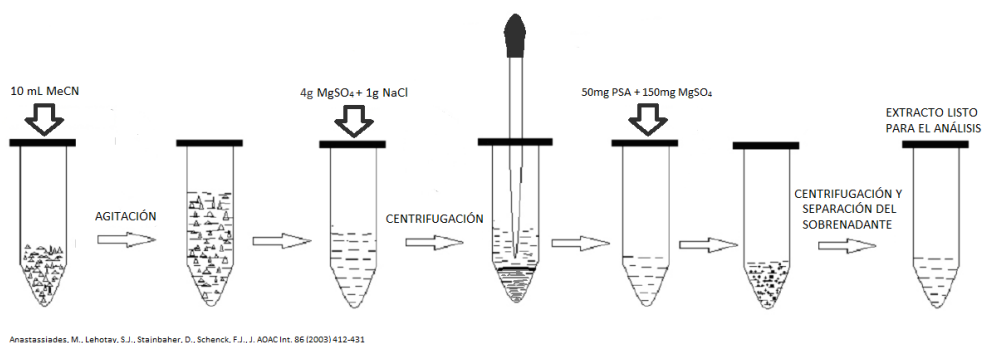
En comparación con la LLE tradicional, la principal ventaja de la MSPD es que tanto la extracción de la muestra como el procedimiento de clean-up se llevan a cabo en un sólo paso utilizando pequeñas cantidades de adsorbente y disolvente. Por lo tanto, no sólo simplifica y acelera el proceso de preparación de la muestra, sino que también reduce el consumo de grandes cantidades de disolventes tóxicos, evita la formación de emulsiones, acorta el tiempo de análisis y aumenta la fiabilidad, selectividad y sensibilidad. Sin embargo, la principal desventaja es la dificultad de asegurar la reproducibilidad de la homogeneización y el procedimiento de molienda debido a que es una operación manual que puede conducir a errores experimentales.



**Figura 2.** Etapas generales en una extracción mediante MSPD.

Por último, una técnica muy utilizada para el análisis de muestras sólidas, sobre todo en la determinación de plaguicidas, es la extracción mediante QuEChERS [31-35]. Esta metodología, que fue desarrollada por primera vez en 2003 [30], combina la extracción convencional, el aislamiento de los analitos de interés y la etapa de limpieza en un sólo paso, evita en gran medida la mezcla, la filtración, las transferencias de grandes volúmenes de disolventes, las etapas de

evaporación/condensación y/o intercambios de disolvente necesarios para la determinación cromatográfica. QuEChERS es la abreviatura de rápido (Quick), fácil (Easy), barato (Cheap), eficaz (Effective), robusto (Rugged) y seguro (Safe), que describe las ventajas de esta técnica respecto a la LLE tradicional. Un posible procedimiento de extracción con QuEChERS se muestra en la Figura 3. El procedimiento está basado en la homogeneización de la muestra, una extracción inicial con un disolvente orgánico (acetonitrilo, por ejemplo) mediante partición líquido-líquido ayudada por una mezcla de sales y tampones adecuados, y una fase de clean-up mediante extracción por dispersión en fase sólida (d-SPE) con amina primaria/secundaria (PSA) y/o C18 y/o carbón grafitizado para eliminar ácidos orgánicos, pigmentos polares, lípidos o esteroides que pueden interferir en el análisis.



**Figura 3.** Procedimiento de extracción con QuEChERS.

En la determinación de compuestos orgánicos persistentes en muestras líquidas la extracción líquido-líquido ha sido la técnica de referencia durante años. Sin embargo, algunas de sus desventajas más importantes como el uso de grandes cantidades de disolventes orgánicos, la formación de emulsiones, la dilución de los analitos, etc. han motivado a los investigadores a desarrollar nuevas técnicas para el tratamiento de muestras líquidas que superen los inconvenientes de la LLE convencional y, en la medida de lo posible, que aumenten las capacidades analíticas de la técnica tradicional. Para ello, se puede considerar que existen dos vertientes diferentes, una basada en la separación de los analitos de la matriz de la muestra mediante su absorción/adsorción en un sólido con características apropiadas para ello, y otra basada en la miniaturización de la LLE original adoptando diferentes configuraciones.

Muchas de las técnicas actualmente en uso para el tratamiento de muestras líquidas están basadas en el atrapamiento de los compuestos de interés en/sobre un sólido con propiedades adecuadas. Una vez separados de la matriz de la muestra, los analitos de interés son eluidos del sólido mediante una pequeña cantidad de disolvente o separados mediante su volatilización por elevación de la temperatura del sólido. De entre las técnicas basadas en la absorción/adsorción de los analitos la extracción en fase sólida (SPE) es, probablemente, la técnica más utilizada [36-42]. De forma general, el procedimiento consiste en pasar la muestra a través de un disco, columna o cartucho que tiene en su interior el sólido adsorbente, previamente acondicionado y activado con agua y/o un disolvente orgánico. Posteriormente, se realiza una limpieza de las posibles interferencias pasando uno o varios disolventes orgánicos mientras que los analitos se mantienen adsorbidos en el sólido. Tras la etapa de clean-up se eluyen los analitos con el disolvente adecuado para el análisis. La SPE es más simple, implica el uso de volúmenes más pequeños de disolventes orgánicos, evita la formación de emulsiones y presenta la posibilidad de la automatización del proceso. Sin embargo, como inconvenientes presenta problemas en el procedimiento cuando las muestras son turbias y/o tienen partículas sólidas suspendidas, la dificultad de elección de los adsorbentes y disolventes adecuados para la separación de analitos con características físico-químicas muy diferentes entre sí, y el aumento del coste de análisis debido al hecho de que los sólidos adsorbentes, en general, no son reutilizables.

Otra técnica de extracción muy extendida en la actualidad para el análisis de muestras líquidas es la microextracción en fase sólida (SPME) [44-48]. Fue desarrollada por primera vez por Pawliszyn y sus colaboradores en 1990 [43] y consiste en una técnica de equilibrio en la cual los analitos son adsorbidos en una fibra de sílice fundida recubierta con una capa de adsorbente apropiada mediante la simple exposición de la fibra al espacio de cabeza de la muestra o por inmersión directa en la muestra líquida. Una vez adsorbidos los analitos son separados de la fibra por volatilización, generalmente, en el interior del sistema de inyección del instrumento en el que se va a realizar la medida instrumental. Esta técnica tiene como claras ventajas la ausencia o reducción de disolventes orgánicos en el procedimiento, la capacidad de preconcentración de los analitos y la posibilidad de automatización del proceso. Como desventajas el alto coste, la falta de una amplia variedad de fibras comerciales disponibles, y en determinadas ocasiones, la posibilidad de efecto memoria, contaminación cruzada entre muestras y escasa reproducibilidad.

En los últimos años se han desarrollado varias técnicas, denominadas en general, técnicas de microextracción con disolvente (SME) o microextracción en fase líquida (LPME) [49-51], que están basadas en la miniaturización de la extracción líquido-líquido convencional, algunas de ellas diseñadas bajo los mismos conceptos de la técnica original, mientras que otras se han desarrollado con configuraciones muy diferentes. Dentro de la LPME se pueden destacar tres técnicas: la microextracción líquido-líquido por dispersión (DLLME), la microextracción en forma de gota (SDME) y la microextracción en fase líquida con fibra hueca (HF-LPME).

La microextracción líquido-líquido por dispersión (DLLME) [53-55], fue desarrollada por primera vez por Assadi y sus colaboradores en 2006 [52]. En esta técnica, una cantidad relativamente pequeña de un disolvente inmisible en agua (típicamente 10-50  $\mu\text{L}$ ) se disuelve en 0,5-2 mL de un disolvente soluble en agua y se inyecta rápidamente con una jeringa en la muestra acuosa (con un volumen de hasta 10 mL, generalmente). La inyección rápida de la mezcla de disolventes orgánicos en el agua hace que el disolvente inmisible en agua se disperse en la masa acuosa como pequeñas micro-gotas en las que se extraen rápidamente los analitos de interés. La fase orgánica enriquecida se separa entonces de la muestra acuosa por centrifugación o congelación (dependiendo de su densidad) y es directamente sometido al análisis instrumental, por lo general, mediante cromatografía de gases. Es posible la aplicación de DLLME a los analitos polares mediante un ajuste previo del pH y /o su derivatización in situ, que se puede lograr ya sea por adición directa del agente de derivatización en la muestra o por la dispersión junto con el disolvente de extracción. La DLLME es una técnica rápida, eficiente (se logra una gran preconcentración de los analitos) y hace uso de pequeños volúmenes de disolventes orgánicos. Como inconveniente tiene que en el procedimiento se incluyen varias manipulaciones manuales lo que hace difícil su automatización y, por tanto, es muy necesario el uso de estándares internos, lo que aumenta el coste del análisis.

La técnica más simple perteneciente al grupo LPME es la microextracción en forma de gota (SDME) [55-58], en la que una gota de un disolvente insoluble en agua se mantiene en suspensión en la punta de una jeringa de cromatografía y se sumerge en la disolución acuosa de la muestra o es expuesta al espacio de cabeza de la muestra (HS-SDME). Los volúmenes de extractante y muestra acuosa típicos están en el rango de 1-8  $\mu\text{L}$  y 1-10 mL, respectivamente. Una vez finalizada la extracción, la gota es recogida en la jeringa e inyectada en el instrumento. Aunque la SDME es una técnica de equilibrio, permite una alta preconcentración de los analitos, una gran reducción del tiempo de análisis y la simplicidad del procedimiento analítico permite la posibilidad de realizarlo de forma manual o (semi)automática usando un

muestreador automático. Como desventaja principal esta técnica presenta la dificultad de mantener la reproducibilidad del procedimiento debido a la inestabilidad de la gota cuando es sometida a una agitación de la muestra o temperaturas, relativamente elevadas.

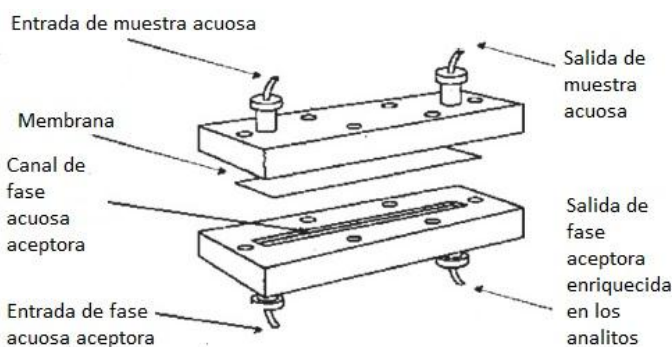
Pedersen-Bjergaard y Rasmussen introdujeron en 1999 una modificación de la técnica LPME para mejorar su estabilidad y fiabilidad, denominada microextracción líquido-líquido-líquido [59]. Básicamente, el disolvente de extracción se coloca dentro de una membrana polimérica porosa y se pone en contacto con la muestra acuosa con los analitos de interés. Los analitos se extraen de la muestra acuosa a través de la fase orgánica en los poros de la HF y luego en la disolución en el interior de la membrana (que puede ser igual o diferente que la fase orgánica presente en los poros). La principal ventaja de esta técnica es que la muestra puede agitarse vigorosamente o calentarse sin pérdidas apreciables del disolvente de extracción, ya que éste está protegido mecánicamente. Por otra parte, al mismo tiempo se produce una limpieza de posibles interferentes porque los compuestos de peso molecular elevado no pueden pasar a través de los poros de la membrana. Es adecuada para analitos orgánicos e inorgánicos con una amplia gama de polaridad, y es posible la automatización de los procesos. La base teórica, posibles configuraciones y ventajas de esta técnica serán tratadas en profundidad a continuación.

## **2. *Técnicas de extracción basadas en el uso de membranas***

### **2.1. *Teoría y principios de la extracción con membranas líquidas***

Las membranas poliméricas pueden aplicarse de diferentes formas para llevar a cabo la separación de los analitos. Pueden utilizarse como simple medio de separación entre las fases donadora y aceptora, que suelen tener una composición química similar o idéntica, por lo general acuosa, aunque a veces son de naturaleza orgánica o gaseosa, y que pueden considerarse una sola fase. No se establece ninguna partición entre las fases. Por lo tanto, las propiedades físicas principalmente, y no químicas, gobiernan el proceso. Entre las técnicas de membrana en una sola fase se pueden destacar la diálisis [200, 201] o la pervaporación [202-208], que es especialmente interesante en la determinación de analitos orgánicos volátiles.

La introducción de las membranas líquidas se remonta a finales de la década de los 80 [60] y principios de los 90 [61, 62] cuando Audunsson, Jönsson y colaboradores comienzan a utilizar una membrana impregnada en un disolvente orgánico entre dos fases acuosas (muestra y fase aceptora) en un sistema de flujo continuo, para promover el paso de los analitos desde la muestra acuosa hasta la fase aceptora situada al otro lado de la membrana [Figura 4]. Posteriormente, como se ha comentado, Pedersen-Bjergaard y Rasmussen introducen el término microextracción en fibra hueca (hollow fiber liquid phase microextraction, HF-LPME) [59] y, desde entonces, se han desarrollado multitud de variantes y aplicaciones en el uso de las membranas poliméricas para la determinación de analitos de diversa naturaleza en muestras medioambientales, biológicas y de alimentos.

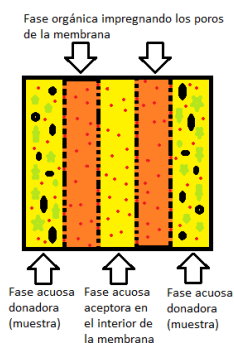


Lindegård, B., Björk, H., Jönsson, J.Å., Mathiasson, L., Olsson, A. M., *Anal. Chem.* 66 (1994) 4490-4497.

**Figura 4.** Dispositivo de extracción en flujo continuo mediante membrana líquida.

En esencia, el funcionamiento de la extracción con membrana líquida consiste en la inmovilización de un disolvente orgánico mediante fuerzas de capilaridad, en los poros de una membrana polimérica para, posteriormente, ponerla en contacto con la muestra acuosa que contiene los analitos. La extracción se lleva a cabo simplemente por difusión pasiva o mediante la ayuda de un agente extractante que favorece el paso de los analitos a través de la membrana. Basadas en este principio existen dos modalidades de trabajo: la extracción con membrana en montajes con dos fases y con tres fases.

En las técnicas de extracción con membrana líquida en tres fases, como se muestra en la Figura 5 se establecen dos interfases: fases acuosa (muestra)/fase orgánica en la membrana y fase orgánica/fase acuosa aceptora (ac / org / ac). Los analitos presentes en la fase acuosa donadora (muestra), después de viajar a través de la fase orgánica de la membrana, se transfieren a la fase acuosa aceptora, donde son retenidos para su posterior análisis. La composición de la fase de aceptora debe ser tal que las moléculas de analito, después de entrar en ella, se transforman en no extraíbles, por ejemplo, por los cambios de pH (para ácidos o bases) o por alguna reacción de formación de complejos. Por lo tanto, se les impide ser disueltas de nuevo a la fase orgánica. Esta “captura” resulta en un transporte de moléculas de analito desde la fase donadora al aceptor, a menudo aparentemente contra el gradiente de concentración del analito, lo que lleva a un enriquecimiento considerable. Seleccionando adecuadamente las condiciones de las fases es posible favorecer la transferencia de masa para obtener la selectividad deseada y un alto grado de enriquecimiento para una amplia gama de analitos. Después de la extracción, la fase aceptora se transfiere a un instrumento analítico, ya sea manualmente o en línea mediante un sistema de flujo. Dado que la fase aceptora obtenida es acuosa, esta técnica es compatible fundamentalmente con cromatografía líquida (HPLC) y electroforesis capilar (CE).



**Figura 5.** Esquema de funcionamiento de un sistema de extracción con membrana líquida en tres fases.

El proceso de extracción de un analito (A) en un sistema de tres fases puede representarse mediante la ecuación:



donde  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_3$  y  $k_4$  son las constantes de velocidad de primer orden de los procesos de extracción. Se puede establecer, por tanto, el siguiente balance de masa para el analito A:

$$C_{d, inicial} \cdot V_d = C_d \cdot V_d + C_m \cdot V_m + C_a \cdot V_a \quad (2)$$

donde  $C_{d, inicial}$  es la concentración inicial de analito en la fase donadora (muestra);  $C_d$ ,  $C_m$  y  $C_a$  es la concentración en la fase donadora, en el disolvente orgánico inmovilizado en la membrana y en el aceptor orgánico, respectivamente, en cualquier instante del proceso;  $V_d$ ,  $V_m$  y  $V_a$  son los volúmenes de las fases donadora, fase orgánica en la membrana y fase aceptora, respectivamente.

Para cada interfase puede establecerse un coeficiente de distribución (D):

$$D_{m/d} = \frac{C_{eq,m}}{C_{eq,d}} = \alpha_d \cdot K_{m/d} \quad (3)$$

$$D_{m/a} = \frac{C_{eq,m}}{C_{eq,a}} = \alpha_a \cdot K_{m/a} \quad (4)$$

donde  $D_{m/d}$  y  $D_{m/a}$  son los coeficientes de distribución del analito entre la fase orgánica en la membrana y la fase donadora, y entre la fase orgánica y la fase aceptora, respectivamente;  $C_{eq, d}$ ,  $C_{eq, m}$  y  $C_{eq, a}$  son las concentraciones de analito en el equilibrio en las fases donadora, fase orgánica y fase aceptora, respectivamente;  $\alpha_d$  y  $\alpha_a$  son la fracción de la concentración de analito extraíble en las condiciones establecidas en la fase donadora y aceptora, respectivamente; y los términos  $K_{m/d}$  y  $K_{m/a}$  son los coeficientes de partición entre las fases orgánica/donadora y las fases orgánica/aceptora, respectivamente. Las ecuaciones (3) y (4) pueden combinarse para obtener el coeficiente de distribución global para el analito entre las fases donadora y aceptora:

$$D_{a/d} = \frac{C_{eq,a}}{C_{eq,d}} = \frac{D_{m/d}}{D_{m/a}} = \frac{\alpha_d \cdot K_{m/d}}{\alpha_a \cdot K_{m/a}} \quad (5)$$

Al ser las fases donadora y aceptora acuosas es previsible que, estableciéndose en ambas fases condiciones similares (excepto el pH), los valores de los coeficientes de partición del analito entre la fase orgánica y las fases acuosas sean muy similares por lo que la ecuación (5) toma una forma muy simple:

$$D_{a/d} = \frac{C_{eq,a}}{C_{eq,d}} \approx \frac{\alpha_d}{\alpha_a} \quad (6)$$

a partir de la cual puede concluirse que en el proceso de extracción con la membrana, en la modalidad de tres fases, el coeficiente de partición del analito con la fase orgánica tiene una importancia pequeña o nula en la posición del equilibrio de distribución, mientras que las condiciones establecidas en las fases acuosas donadora y aceptora (el pH fundamentalmente), que definen las fracciones ionizables del analito son las que determinan el grado de distribución del mismo.

En el equilibrio el balance de masas expresado en la ecuación (2) combinado con las ecuaciones (3) y (4) queda:

$$C_{d, inicial} \cdot V_d = \frac{\alpha_a \cdot K_{m/a} \cdot C_{eq,a}}{\alpha_d \cdot K_{m/d}} \cdot V_d + \alpha_a \cdot K_{m/a} \cdot C_{eq,a} \cdot V_m + C_{eq,a} \cdot V_a \quad (7)$$

El primer término en el lado derecho de esta ecuación, representa la cantidad de analito que queda en la fase donadora, el segundo la cantidad que se encuentra en el disolvente orgánico de la membrana, y la última la cantidad que se extrae en el aceptor. Obviamente, en la mayoría de los casos se pretende que la extracción sea tan eficiente como sea posible, lo que significa que el primer y segundo término deben ser insignificantes en comparación con el tercero.

La concentración de aceptor,  $C_a$ , es cero en el comienzo de la extracción y aumenta sucesivamente, por lo general a valores muy por encima de la concentración que posee el analito en la muestra (fase donadora),  $C_{d, inicial}$ . Se produce con la extracción con la membrana líquida, por tanto, un enriquecimiento de la concentración de analito en la fase aceptora. El factor de enriquecimiento  $E_f$  (a veces, también denominado  $E_e$  o  $E$ ) que se puede lograr mediante la extracción se define como la relación entre  $C_a$  y  $C_{d, inicial}$ :

$$E_f = \frac{C_a}{C_{d, inicial}} \quad (8)$$

En el equilibrio, el factor de enriquecimiento queda:

$$E_{f,eq} = \frac{1}{\left( \frac{\alpha_a \cdot Km/a}{\alpha_d \cdot Km/d} + \alpha_a \cdot Km/a \cdot \frac{V_m}{V_d} + \frac{V_a}{V_d} \right)} \quad (9)$$

Por otro lado, la eficiencia de la extracción ( $E$ ) puede definirse como la relación del número de moles extraídos en la fase aceptora entre el número de moles iniciales presentes en la muestra:

$$E = \frac{C_a \cdot V_a}{C_{d,inicial} \cdot V_d} \quad (10)$$

En el equilibrio, el factor de enriquecimiento queda:

$$E_{eq} = \frac{1}{\left( \frac{\alpha_a \cdot Km/a \cdot V_d}{\alpha_d \cdot Km/d \cdot V_a} + \alpha_a \cdot Km/a \cdot \frac{V_m}{V_a} + 1 \right)} \quad (11)$$

A partir de esta ecuación se puede concluir que la eficiencia de la extracción en la modalidad de tres fases es controlada por los dos coeficientes de partición individuales, y por los volúmenes de la muestra, la fase orgánica y la fase aceptora. En general, altos coeficientes de partición se traducen en una alta eficiencia, y esto se puede obtener mediante la selección apropiada del disolvente orgánico en la membrana y las condiciones de pH en las disoluciones acuosas. Además, para una alta eficiencia, los volúmenes de muestra y de fase orgánica deben ser tan pequeños como sea posible. El factor de enriquecimiento para el analito se puede relacionar con la eficiencia de la extracción en cualquier momento mediante la siguiente ecuación:

$$E_f = \frac{C_a}{C_{d,inicial}} = \frac{V_d \cdot E}{V_a} \quad (12)$$

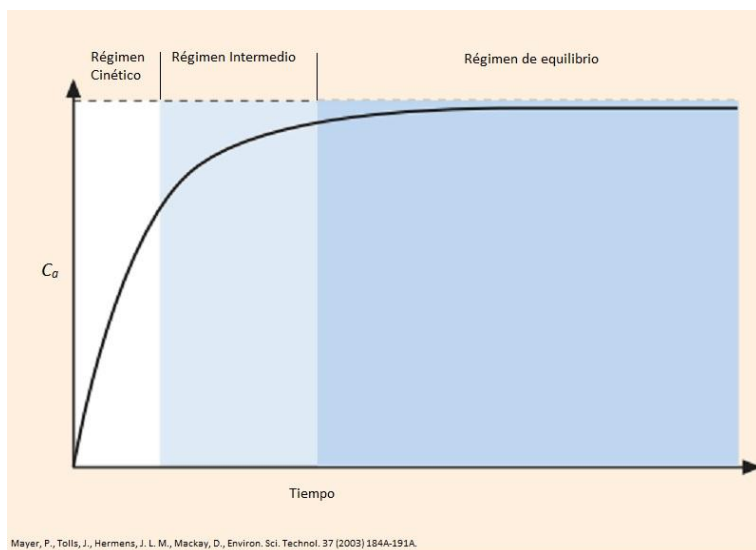
Para hacer un estudio cinético del aumento de la concentración del analito en la fase aceptora durante el proceso de extracción, podemos plantear una ecuación diferencial suponiendo que la transferencia de masa entre las fases donadora y aceptora es proporcional a la diferencia de concentración global entre ellas. Teniendo en cuenta las concentraciones en las tres fases en cualquier instante nos queda:

$$\frac{\partial C_a}{\partial t} = k \left( C_{d,inicial} - \left( \frac{\alpha_a \cdot Km/a}{\alpha_d \cdot Km/d} + \alpha_a \cdot Km/a \cdot \frac{V_m}{V_d} + \frac{V_a}{V_d} \right) \cdot C_a \right) \quad (13)$$

La solución a esta ecuación viene dada por la ecuación de primer orden:

$$E_f = \frac{C_a}{C_{d, inicial}} = E_{f, eq} \cdot (1 - \exp(-k \cdot \frac{1}{E_{f, eq}} \cdot t)) \quad (14)$$

En esta ecuación  $k$  es una constante para la transferencia de materia global desde la fase donadora a la fase aceptora. Obviamente, esta expresión es una simplificación, ya que el proceso de extracción con membrana líquida en la modalidad de tres fases puede ser dividido en varias etapas de difusión del analito entre las fases, y cada una de ellas, posee su propia caracterización cinética [63]. Esta ecuación puede representarse como se muestra en la Figura 6 [64]. Como puede observarse, el perfil de extracción del analito a la fase aceptora posee tres regiones bien distintas: un primer tramo de subida, prácticamente lineal, llamado régimen cinético, a continuación, una región intermedia, y, finalmente, el régimen de equilibrio en el cual, el valor del factor de enriquecimiento se acerca a su valor de equilibrio,  $E_{f, eq}$  de acuerdo con la ecuación (9). Para cada aplicación concreta, al realizar la extracción, puede interesar que la variación de la concentración del analito en la fase aceptora en función del tiempo se ajuste a un régimen cinético o, por el contrario, puede interesar que el sistema alcance el régimen de equilibrio.



**Figura 6.** Perfil de extracción del analito a la fase aceptora en función del tiempo.

Así, en muchas aplicaciones, la extracción se detiene mucho antes de que se establezca el equilibrio, es decir, la extracción se lleva a cabo dentro del régimen cinético de la curva de extracción [Figura 6] de forma que, como una buena aproximación, la concentración de analito en la fase aceptora,  $C_a$ , se incrementará linealmente con el tiempo, y en un momento dado es proporcional a la concentración inicial del analito en la muestra,  $C_{d, inicial}$ . Esta es la base de gran parte, quizás de la mayoría, de los trabajos existentes en la bibliografía basados en la extracción con membrana, donde la extracción es incompleta y se detiene después de un cierto tiempo, evitando que se alcance el equilibrio. Obviamente, si la pendiente de la curva de extracción varía con algún parámetro experimental, la precisión de la extracción se ve comprometida, por lo tanto, se necesita un control estricto de las condiciones de extracción para obtener una buena reproducibilidad. Por otra parte, si la extracción se deja evolucionar demasiado, hasta la región intermedia de la Figura 6, la proporcionalidad entre la concentración del analito en la muestra y en la fase aceptora no será completamente cierta, de forma que se producirán errores en la medida de la concentración. Esto requiere un estudio estricto del tiempo necesario para la extracción.

Por otro lado, se pueden establecer unas condiciones para la extracción de forma que se produzca una extracción exhaustiva de los analitos alcanzándose el equilibrio. Por ejemplo, en una sencilla configuración de permeación para analitos ácidos o básicos, la “captura completa” en la fase aceptora se logra mediante el establecimiento de las condiciones de pH del aceptor de modo que  $\alpha_a$  sea un número muy pequeño, próximo a cero. Como regla general, para analitos básicos, el pH de la fase aceptora debe ser menor de  $pKa - 3,3$  y el pH de la fase donadora mayor que  $pKa + 2$  (y para analitos ácidos al revés) [65]. Esto conduce a un valor del coeficiente de distribución en el equilibrio mayor de 2000 y a un factor de enriquecimiento que sólo depende de la relación de volúmenes de las fases donadora y aceptora ( $\frac{V_d}{V_a}$ ). En la medida que estos volúmenes son conocidos razonablemente bien, la incertidumbre del proceso de extracción es potencialmente más pequeña que para el modo de extracción en el régimen cinético. Se ha demostrado experimentalmente que es posible obtener una mejor repetitividad y reproducibilidad y menor efecto matriz que con la extracción en el régimen lineal [66]. Sin embargo, es importante que el tiempo de extracción sea lo suficientemente largo de manera que se alcance el equilibrio, incluso si la cinética para la transferencia de materia en una determinada muestra es más lenta. También es muy importante que las condiciones de “captura completa” sean válidas durante

todo el transcurso de la extracción, lo que requiere una fase aceptora tamponada de manera eficiente.

Para la extracción con membrana líquida en dos fases los principios básicos son más simples que los expuestos para la variante en tres fases, ya que sólo hay una interfase implicada en la extracción, por lo general, entre una disolución acuosa donadora a una fase orgánica aceptora [Figura 7]. En este caso, el extracto final de la extracción es un disolvente orgánico, por lo que, la medida analítica es más fácil realizarla con cromatografía de gases y cromatografía líquida (HPLC) en fase normal.

Esta modalidad es químicamente equivalente a una sola extracción líquido-líquido convencional. En este caso, la extracción es impulsada por la diferencia de concentración de los analitos en el disolvente orgánico y la fase acuosa donadora (muestra)

$$A_{muestra} \rightleftharpoons A_{fase\ orgánica\ aceptora} \quad (15)$$

$$\Delta C = \alpha_d \cdot K_d \cdot C_d - C_a \quad (16)$$

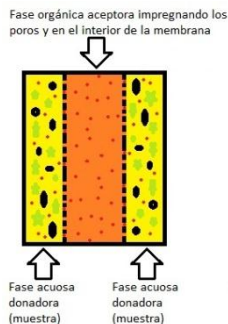
donde  $K_d$  es el coeficiente de partición entre la fase orgánica aceptora y la fase acuosa donadora:

$$K_d = \frac{C_a}{\alpha_d \cdot C_d} \quad (17)$$

Para los compuestos no cargados  $\alpha_d = 1$ , mientras que para los analitos cargados o fácilmente ionizables será la fracción de la concentración de analito extraíble en las condiciones establecidas en la fase donadora. En el equilibrio la diferencia de concentración,  $\Delta C$ , debe ser cero, por lo que el coeficiente de distribución en el equilibrio viene dado por:

$$D_{eq} = \frac{C_{eq,a}}{C_{eq,d}} = \alpha_d \cdot K_d \quad (18)$$

Por lo tanto, en la extracción con membrana líquida en la modalidad de dos fases, el coeficiente de partición fase orgánica/fase acuosa,  $K_d$ , regula directamente la extracción, en contraste con el modo trifásico, donde las condiciones establecidas para la "captura" de los analitos en la fases aceptora (por ejemplo el pH) tienen una mayor influencia. La técnica es muy adecuada para los compuestos relativamente apolares o no polares, es decir, con altos valores de  $K_d$ .



**Figura 7.** Esquema de funcionamiento de un sistema de extracción con membrana líquida en dos fases.

En muchos casos, el coeficiente de reparto octanol-agua ( $\text{Log } K_{ow}$ ) se utiliza como una medida general de la hidrofobicidad de los compuestos y una estimación para el coeficiente de partición, incluso si los disolventes orgánicos utilizados en la membrana son, normalmente, distintos del octanol. Como una regla general, la extracción con membrana líquida en su modalidad de dos fases será adecuada para aquellos compuestos que, aun no conociéndose el valor real para  $K_d$ , tengan un valor del  $\text{Log } K_{ow} > 3$

Para la modalidad de dos fases, las expresiones para el factor de enriquecimiento y la eficiencia de la extracción en el equilibrio, ecuaciones (9) y (11) respectivamente, se simplifican y quedan:

$$E_{f,eq} = \frac{1}{\left(\frac{1}{\alpha_d \cdot K_d} + \frac{V_a}{V_d}\right)} \quad (19)$$

$$E_{eq} = \frac{1}{\left(\frac{V_d}{\alpha_d \cdot K_d \cdot V_a} + 1\right)} \quad (20)$$

Para la modalidad de dos fases también es válido el planteamiento de la ecuación (14) y las consideraciones sobre la cinética del proceso de extracción realizados para la modalidad en tres fases (con las simplificaciones correspondientes, obviamente) y que se observan en el perfil de la Figura 6.

### **2.2. Dispositivos y configuraciones**

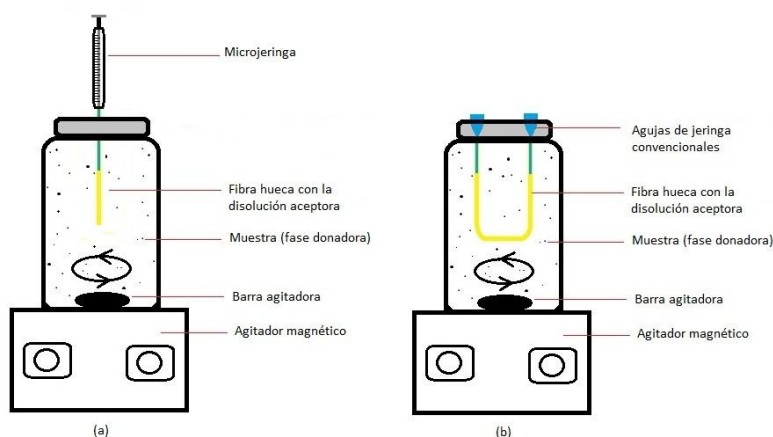
La naturaleza de la fibra hueca es de vital importancia en LPME ya que funciona como soporte y como contenedor para la fase aceptora. Se han utilizado materiales polímeros como el polifluoruro de vinilideno (PVDF) [67] o la polisulfona (PSU) [68], aunque la mayoría de los trabajos existentes en la bibliografía hacen uso de fibras poliméricas de polipropileno (PP). El polipropileno es resistente a los disolventes orgánicos, es flexible y resistente mecánicamente, las fases orgánicas utilizadas en LPME se inmovilizan fácil y fuertemente en sus poros, y no presenta serios problemas de adsorción ya que no se producen interacciones entre los analitos y el propio polímero. Dentro del conjunto de fibras de polipropileno, el tipo de membrana hueca más popular es el que presenta un diámetro interno de 600 micras de fibra hueca con paredes de 200 micras de espesor, poros de 0,2 micras, y con un 75% de porosidad. Con este diámetro interno, la aguja de una microjeringa (de cromatografía de gases, por ejemplo) puede ser insertada en el interior de la membrana (lumen), para inyectar y/o eliminar la fase de aceptora. El espesor de la pared de 200 micras es muy apropiado, ya que posee una buena estabilidad mecánica y no afecta al rendimiento de la extracción. Una pared más delgada es adecuada para un mayor rendimiento de la extracción ya que esto proporciona una transferencia de masa más rápida, pero esto disminuye la estabilidad mecánica del sistema. Una pared más gruesa aporta una alta estabilidad mecánica pero puede afectar negativamente en el rendimiento de la extracción. Por último, el tamaño de poro de 0,2 micras también parece ser el más apropiado debido a que los disolventes orgánicos utilizados como fase aceptora quedan fuertemente inmovilizados en este tipo de estructura porosa, y este tamaño de poro relativamente grande asegura la difusión eficiente de los analitos.

Dependiendo de la disposición de la fibra se pueden encontrar en la bibliografía diferentes configuraciones para llevar a cabo la microextracción con membrana líquida, de las cuales se pueden destacar las siguientes:

- La configuración más utilizada consiste en colocar la fibra en forma longitudinal, con un extremo acoplado a la aguja de una microjeringa y el otro extremo en contacto con la muestra, bien directamente, o bien sellado previamente para evitar pérdidas de la disolución aceptora [Figura 8a]. Una vez acoplada la membrana a la aguja de la microjeringa los poros de la fibra son impregnados con el disolvente orgánico. Posteriormente, el montaje se introduce en la muestra y se baja el émbolo para que la disolución aceptora quede en el interior de la fibra. Una vez

terminada la extracción, se sube el émbolo de la microjeringa y esta disolución aceptora es recuperada para su inyección en el sistema instrumental.

- En la Figura 8b se muestra una representación de una de las configuraciones más utilizadas. En esta configuración, cada extremo de la fibra se conecta a una aguja de tipo médico convencional, de manera que la fibra queda colocada formando una especie de U, en la que una de las agujas sirve como guía para introducir la disolución aceptora en el interior de la fibra con una microjeringa y la otra sirve como vía de salida para recuperar dicha disolución tras la extracción para su posterior introducción en el instrumento de análisis.



**Figura 8.** (a) Representación esquemática de la configuración de la membrana en forma longitudinal acoplada a una microjeringa. (b) Representación esquemática de la configuración en forma de U.

- Otra modalidad muy utilizada es la que se conoce como microextracción con barra de disolvente, SBME (Solvent bar microextraction) [68] [Figura 9]. En esta modalidad un extremo de la fibra es sellado inicialmente y a continuación la membrana se sumerge en el disolvente orgánico para impregnar los poros de la misma. Posteriormente, es introducida la fase aceptora en el interior de la fibra y se sella el otro extremo, antes de introducirla directamente en la disolución donadora. Una vez finalizada la extracción, se corta uno o ambos extremos y con la ayuda de una microjeringa se recoge el extracto para su posterior análisis.



**Figura 9.** Representación esquemática de la modalidad SBME.

### **2.3. Ventajas y aplicaciones del uso de membranas**

Es evidente, teniendo en cuenta el gran número de aplicaciones publicadas basadas en el uso de membranas poliméricas, que la microextracción con membrana líquida tiene un número importante de ventajas en el tratamiento de muestra, en comparación con otras técnicas utilizadas para el mismo fin. En primer lugar, es destacable la fiabilidad y sencillez de, prácticamente, todas las modalidades de LPME. En segundo lugar, la importante reducción en las cantidades de disolventes orgánicos necesarios para llevar a cabo la extracción hace posible encuadrar a la LPME dentro de las técnicas “verdes”, que son respetuosas con el medio ambiente y son muy seguras para el analista. También es muy destacable el bajo coste de las fibras disponibles comercialmente, principalmente de polipropileno y que, en lo que respecta a las características analíticas de la técnica, hace posible el uso de fragmentos de fibra desechables para cada análisis, lo que evita el efecto memoria y la contaminación entre muestras, problemas muy importantes presentes en otras técnicas como la SPE o la SPME. Finalmente, como ventajas más destacadas de las técnicas que hacen uso de las membranas poliméricas aparecen los altos factores de enriquecimiento obtenidos para una enorme variedad de analitos determinados en muestras de muy diversa naturaleza, y la simultánea y eficiente eliminación de interferencias (clean-up) que evita posibles etapas posteriores de limpieza y cambios de disolventes que llevan implícitos un mayor error en la medida, pérdida de tiempo y un aumento importante del coste final del análisis.

Tras el primer trabajo de HF-LPME en el año 1999 [59], han sido muchos los investigadores que han aplicado esta técnica, utilizando las modalidades en dos y

## *Introducción*

---

tres fases, para la extracción de compuestos orgánicos de muestras medioambientales, biológicas y de alimentos. En la Tabla 1 se muestran algunos ejemplos de publicaciones que hacen uso de este tipo de extracción con membranas.

Tabla 1. Aplicaciones de las técnicas analíticas de extracción basadas en el uso de membranas poliméricas.

Análitos	Muestra	Modalidad	Referencia
<b>Ácidos grasos</b>			
Ácidos grasos	Aceites vegetales	Dos fases	[69]
	Agua	Tres fases	[70]
<b>Aminas</b>			
Aminas alifáticas	Agua residual y agua de pozo	Dos fases	[73]
Aminas aromáticas	Agua	Tres fases	[74]
	Agua de grifo y superficial	Tres fases	[75]
	Salsa de camarones, salsa de tomate	Tres fases	[71]
	Agua de río	Dos fases	[72]
<b>Aminas biogénicas</b>			
Aminas primarias	Zumo de frutas	Tres fases	[76]
<b>Compuestos fenólicos</b>	Agua de grifo, de río y residual	Dos fases	[77]
Ácidos fenólicos	Orina humana	Dos fases	[111]
Alquifrenoles	Orina humana	Dos fases	[78]
Bifenol A	Agua del grifo y superficial	Dos fases	[79]
Cbrotfenoles	Agua de río y lixiviados	Tres fases	[80]
	Agua residual	Tres fases	[81]
	Agua	Tres fases	[82] [83] [84]
	Agua de río y de lago	Tres fases	[85]
	Agua de grifo	Tres fases	[86]
	Agua y orina humana	Dos fases	[87]
	Suelo y agua subterránea	Dos fases	[88]
<b>Disruptores endocrinos fenólicos</b>	Agua	Dos fases	[109]
	Agua marina	Dos fases	[110]
	Agua de río, lluvia y marina	Dos fases	[89]
<b>Nitrofenoles</b>	Plasma humano	Tres fases	[90] [91]
	Agua de río y marina	Tres fases	[92]
	Agua	Tres fases	[93] [84]
	Agua marina	Tres fases	[94]
	Aire	Tres fases	[95]
<b>Hidrocarburos alifáticos y aromáticos</b>			
BTEX	Agua de río y residual	Dos fases	[96]
Hidrocarburos alifáticos y aromáticos	Agua de lluvia	Tres fases	[97]
Hidrocarburos aromáticos	Plasma y orina humana	Dos fases	[98]

Análitos	Muestra	Modalidad	Referencia
PAHs	Agua	Dos fases	[99]
	Agua residual y de río	Dos fases	[100]
	Suelo	Dos fases	[101] [102]
	Agua	Tres fases	[103]
	Aerosoles	Dos fases	[104]
	Suelo y sedimentos	Dos fases	[105]
	Agua de lluvia	Dos fases	[168]
<b>Fármacos y compuestos relacionados con la salud</b>			
Antibióticos	Agua	Dos fases	[106]
	Leche bovina	Tres fases	[107]
	Plasma y orina humana	Dos fases	[106]
Antiraquimonas	Agua residual	Tres fases	[112]
Estrógenos	Sangre y orina humana	Tres fases	[117]
Fármacos (anfetaminas)	Orina humana	Tres fases	[127]
Fármaco (antidepresivo)	Plasma y orina humana	Tres fases	[118] [123]
Fármacos (antidepresivos)	Plasma humano	Tres fases	[121]
	Agua residual	Tres fases	[128]
Fármaco y productos de degradación (Desparasitante veterinario)	Agua de grifo y de lago	Dos fases	[120]
Fármacos (drogas ácidas)	Agua de río y residual	Dos fases	[129]
	Agua residual	Tres fases	[130] [131]
Fármaco (droga anti-diabetes)	Plasma y orina humana	Tres fases	[124]
Fármaco (droga anti-inflamatoria no esteroidea)	Orina humana	Tres fases	[132]
Fármacos (drogas anti-inflamatorias no esteroideas)	Agua residual	Dos fases	[133]
	Agua residual	Tres fases	[134] [136] [137]
	Agua de río y residual	Tres fases	[135]
Fármacos (drogas básicas)	Agua	Tres fases	[125]
	Agua residual	Tres fases	[126]
Fármacos (drogas hidrofílicas)	Plasma y orina humana	Tres fases	[116]
Fármacos (drogas hidrofóbicas básicas)	Leche materna	Tres fases	[122]
Fluoroquinolonas	Agua superficial	Tres fases	[113]
Hormonas esteroideas	Orina bovina y Agua superficial, de río y residual	Tres fases	[114]
Producto de degradación del Ibuprofeno	Agua de grifo y residual	Dos fases	[115]
Sulfonamidas	Agua residual	Dos fases	[119]
	Agua de río y residual	Tres fases	[138]
	Miel	Tres fases	[139]

Análisis	Muestra	Modalidad	Referencia
<b>PBDEs y retardantes de llama</b>			
PBDEs	Agua de grifo, de río y residual Suelo, agua y suero humano Agua residual Agua de grifo, de río y residual	Dos fases Dos fases Dos fases Dos fases	[140] [141] [142] [143]
Retardantes de llama organofosforados y plastificantes			
PCBs	Plasma humano	Dos fases	[144]
PCBs	Agua Agua residual Agua de río Sedimentos marinos	Dos fases Dos fases Dos fases Dos fases	[145] [142] [146] [173]
<b>Plaguicidas</b>			
Fungicidas	Zumo de naranja Agua	Tres fases Dos fases	[147] [148]
Glifosato y ácido amino-fenil-fosfónico	Agua de río	Tres fases	[149]
Herbicidas (derivados del ácido clorofenoxiacético)	Leche bovina Agua Agua de grifo y de río Agua de río	Tres fases Tres fases Tres fases Dos fases	[150] [153] [154] [155] [156] [159] [160]
Herbicidas (atracina y derivados)	Agua residual y subterránea Agua superficial	Tres fases Dos fases	[151] [152]
Herbicidas (derivados de la sulfonilurea)	Agua de grifo y residual	Dos fases	[157]
Herbicidas (triacina y derivados)	Lodo	Dos fases	[158]
Insecticidas	Leche y sandía	Dos fases	[161]
Penta y hexaclorobenzeno	Agua potable y de río	Dos fases	[162]
Plaguicidas carbamatos	Suelo Agua de grifo Vegetales y fruta Vino tinto	Dos fases Dos fases Dos fases Tres fases Dos fases	[163] [164] [176] [177]
Plaguicidas organoclorados	Agua Agua marina Agua de lluvia Agua, tomate y fresa Vino	Dos fases Dos fases Dos fases Dos fases Dos fases	[165] [166] [167] [168] [169] [170]

Análitos	Muestra	Modalidad	Referencia
Plaguicidas organofosforados	Té	Dos fases	[171]
	Agua de lago	Dos fases	[172]
	Sedimentos marinos	Dos fases	[173]
	Suelo	Dos fases	[184]
	Agua de lago	Dos fases	[174]
	Muestras vegetales	Dos fases	[175]
	Agua residual	Dos fases	[178]
	Agua	Dos fases	[179]
	Agua y suelo	Dos fases	[180]
	Agua medioambiental	Dos fases	[181]
Plaguicidas (mezcla de compuestos con Cl, P y S)	Vino y cerveza	Dos fases	[182]
	Agua de río y de lago	Dos fases	[183]
	Tomate, pepino y pimiento	Tres fases	[184]
<b>Otros</b>			
Ácidos haloacéticos	Agua	Tres fases	[186]
	Agua de grifo y mineral	Dos fases	[187]
	Agua de grifo y de piscina	Dos fases	[188]
Anisoles halogenados	Agua de grifo y residual	Dos fases	[189]
	Fresa y salsa de chile, aceite de pimiento, huevo salado	Dos fases	[190]
Colorantes Sudan	Agua	Dos fases	[191]
Disolventes halogenados	Agua de grifo y mineral	Dos fases	[192]
Esteres de ftalatos	Zumo de coco	Tres fases	[193]
Fitohormonas	Agua de río	Dos fases	[194]
Haloéteres	Patata, berenjena, tomate, salsa y zumo de tomate, pimiento, salsa de pimiento	Dos fases	[195]
Nicotina	Vino	Dos fases	[196]
Ocratoxina A	Vino y cerveza	Dos fases	[197]
Ocratoxina A y tóxina T-2	Agua residual	Dos fases	[198]
Taninos	Agua de grifo y mineral	Dos fases	[199]
Trihalometanos			

### **3. Microcontaminantes orgánicos de interés medioambiental**

#### **3.1. Plaguicidas organoclorados**

Por plaguicida se entiende cualquier sustancia o mezcla de sustancias, de carácter orgánico o inorgánico, destinada a prevenir, destruir, atraer, repeler o combatir cualquier plaga, incluidas las especies indeseadas de plantas o animales, durante la producción, almacenamiento, transporte, distribución y elaboración de alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales, o que pueda administrarse a los animales para combatir ectoparásitos. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladoras del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o inhibidores de la germinación, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra el deterioro durante el almacenamiento y transporte [209, 210].

En cuanto a su formulación química existe una gran variedad de plaguicidas que pueden clasificarse en diversos grupos: arsenicales, carbamatos, derivados de cumarina, derivados de la urea, dinitrocompuestos, nitroanilinas, organoclorados, organofosforados, organometálicos, piretroides y triazinas, siendo los compuestos organoclorados de los más numerosos y de los más utilizados (por ejemplo el DDT, lindano, endrin, dieldrin, etc). Los plaguicidas organoclorados presentan, en general, una estructura base cíclica o bicíclica con átomos de cloro en sus posiciones libres. Sus propiedades físico-químicas les confieren una gran estabilidad a los procesos químicos medioambientales y una gran tendencia a la bioacumulación y biomagnificación en los tejidos grasos de los seres vivos, por lo cual, la mayoría de ellos han sido retirados del mercado y se ha prohibido su uso en los países desarrollados [211]. Sin embargo, debido a su efectividad y bajo coste su uso sigue generalizado en países en vías de desarrollo.

El uso extensivo de los plaguicidas organoclorados durante años ha provocado su presencia en el aire, el suelo y el agua. Representan un peligro de contaminación de las aguas, tanto superficiales como subterráneas. En la Unión Europea, el control de la contaminación del agua por plaguicidas constituye uno de los ámbitos de actuación más importantes incluidos en la legislación de la EU. De hecho, existe una legislación muy restrictiva en materia de plaguicidas en aguas potables, establecida en 1998, por la que se asigna para aguas de bebida o susceptibles de bebida, como nivel permitido el valor  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$  para cada plaguicida individual o  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$  para el total de plaguicidas, (excepto para aldrín, dieldrín, heptacloro y heptacloro epóxido,

cuya máxima concentración permitida es de  $0,03 \mu\text{g L}^{-1}$ ) [212, 213] mientras que la EPA (Environmental Protection Agency) establece concentraciones máximas individuales para cada plaguicida en concreto [214]. Por otra parte, buena parte de los plaguicidas organoclorados acaban llegando al mar, donde estas sustancias pueden ser bioacumuladas a lo largo de la cadena trófica, siendo el hombre el final de dicha cadena. Muchos de estos plaguicidas son biodegradables, se volatilizan o no se bioacumulan y no persisten demasiado en el tiempo, pero otros se caracterizan por su enorme persistencia en el medio ambiente (por ejemplo el DDT), su transformación en otras sustancias incluso más tóxicas y perjudiciales o su enorme capacidad para acumularse en el tejido graso de animales marinos [215-218].

Los plaguicidas suelen llegar al hombre en dosis pequeñas, a través de la ingesta de alimentos que contengan estas sustancias. También pueden absorberse por la piel o inhalarse por las vías respiratorias. Es complicado conocer la dosis ingerida y el tiempo de exposición, así como si la exposición es a una o más sustancias, lo que hace difícil la detección de las posibles intoxicaciones y su tratamiento. Se considera que tienen una toxicidad extrema, con efectos negativos sobre el sistema endocrino, además de ser potencialmente mutagénicos y carcinogénicos. Afectan al sistema nervioso y se acumulan en órganos con alto contenido de tejido graso [219-222].

En relación a la ingesta de plaguicidas, la concentración máxima de residuos de un plaguicida en un producto alimentario, incluyendo tanto la superficie como la parte interna del mismo permisible para su consumo se denomina límite máximo de residuos, MRL (Maximum Residue Limit). Los MRL se expresan en mg de residuo de plaguicida por Kg de producto alimentario y se basan en datos de BPA (Buenas Prácticas Agrícolas) y de los datos recopilados por la Organización Mundial de la Salud (WHO) sobre datos toxicológicos de cada plaguicida [223].

La Unión Europea regula el uso de plaguicidas en los alimentos de tal forma que en todos los casos en que no haya estudios que demuestren la ausencia de peligro para la salud de los consumidores, no se permitirá la presencia de ningún residuo a niveles superiores a  $0,01 \text{ mg Kg}^{-1}$ . Se contemplarán excepciones con las sustancias de las cuales un nivel de  $0,01 \text{ mg Kg}^{-1}$  no sea seguro para los consumidores, y se establecerán MRLs inferiores [224]. La UE está armonizando gradualmente los MRLs. Las directivas también permiten a los Estados miembros tomar medidas a nivel nacional a la espera de decisiones comunitarias sobre MRLs específicos.

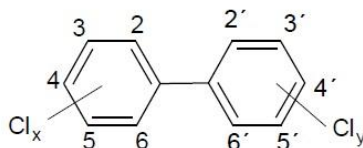
La legislación actual sobre los MRLs en plaguicidas deriva de cuatro directivas fundamentales:

- Directiva 76/895/CEE que establece los MRLs para frutas y vegetales [225].
- Directiva 86/362/CEE que establece los MRLs para cereales y productos derivados del cereal [226].
- Directiva 86/363/CEE que establece los MRLs para productos de origen animal [227].
- Directiva 90/642/CEE que establece los MRLs para productos derivados de las plantas, incluyendo frutas y vegetales [228].

A partir de estas cuatro directivas se han ido modificando las normativas que regulan los MRLs de cada plaguicida en uso, existiendo hoy en día una amplia lista de modificaciones a las anteriores directivas que se han llevado a cabo teniendo en cuenta la aparición de nuevos compuestos, recientes estudios toxicológicos sobre los compuestos existentes o por la aparición de posibles casos de intoxicaciones, entre otros factores a tener en cuenta en el establecimiento de los MRLs de plaguicidas.

### 3.2. Bifenilos policlorados, PCBs

Los bifenilos policlorados, PCBs (polychlorinated biphenyls) son una familia de compuestos organoclorados, compuesta por una serie de 209 congéneres, los cuales se forman mediante la cloración de diferentes posiciones libres del bifenilo [Figura 10]. Su fórmula empírica es  $C_{12}H_{10-n}Cl_n$  siendo  $n = x+y$  [Figura 10], y con  $n$  comprendido entre 1 y 10, siendo mayoritarios los congéneres con 2 a 7 cloros. De este modo, según el grado de sustituciones de cloro sobre la molécula, los PCBs se clasifican en diez grupos de homólogos, caracterizados por un mismo peso molecular pero con diferente disposición espacial [Tabla 2].



**Figura 10.** Estructura general de los bifenilos policlorados (PCBs).

Los anillos bencénicos del bifenilo pueden rotar alrededor del enlace C-C sencillo que los une. Así, si las posiciones 2, 2', 6 y 6' no tienen ningún cloro los bifenilos se mantienen coplanares, hablando por tanto de PCBs coplanares o no-orto. Si tenemos una posición sustituida en cada lado, son PCBs mono-orto sustituidos, y el resto son los PCBs no coplanares.

La nomenclatura adoptada para los distintos congéneres de los bifenilos policlorados ha sufrido diversas modificaciones a lo largo del tiempo, siendo la más utilizada en la actualidad y la que está aceptada por la IUPAC ("BZ"), la que denomina a los 209 congéneres por orden numérico ascendente [Tabla 2] [229]. Los PCBs casi siempre se presentan como mezclas (Aroclor<sup>®</sup>, Kanechlor<sup>®</sup>, Clophen<sup>®</sup>, Chlorofen<sup>®</sup>, Phenoclor<sup>®</sup> y Pyralène<sup>®</sup>).

**Tabla 2.** Nomenclatura y propiedades físico-químicas de los PCBs.

Grupo de homólogos	Peso molecular	Número de isómeros (Nº nomenclatura IUPAC)	Presión de vapor (Pa)	Solubilidad en agua (g/m <sup>3</sup> )	Log K <sub>ow</sub> <sup>†</sup>
Monoclorados	188,7	3 (1-3)	1,100	4,000	4,7
Diclorados	223,1	12 (4-15)	0,240	1,600	5,1
Triclorados	257,5	24 (16-39)	0,054	0,650	5,5
Tetraclorados	292,0	42 (40-81)	0,012	0,260	5,9
Pentaclorados	326,4	46 (82-127)	2,6 x 10 <sup>-3</sup>	0,099	6,3
Hexaclorados	360,9	42 (128-169)	5,8 x 10 <sup>-4</sup>	0,038	6,7
Heptaclorados	395,3	24 (170-193)	1,3 x 10 <sup>-4</sup>	0,014	7,1
Octaclorados	429,8	12 (194-205)	2,8 x 10 <sup>-5</sup>	5,5 x 10 <sup>-3</sup>	7,5
Nonaclorados	464,2	3 (206-208)	6,3 x 10 <sup>-6</sup>	2,0 x 10 <sup>-3</sup>	7,9
Decaclorados	498,7	1 (209)	1,4 x 10 <sup>-6</sup>	7,6 x 10 <sup>-4</sup>	8,3

<sup>†</sup> K<sub>ow</sub>: Coeficiente de reparto octanol-agua.

Los PCBs son sólidos o líquidos aceitosos, cuyas propiedades fisicoquímicas dependen del grado de cloración y de si son no-orto, mono-orto o no coplanares. Así, la presión de vapor o su solubilidad en agua disminuyen con el grado de cloración [Tabla 2]. En general, poseen una baja conductividad eléctrica y una elevada estabilidad térmica., son poco sensibles a la radiación ultravioleta y son difícilmente biodegradables, lo que les confiere una alta estabilidad en el medio

ambiente. Asimismo, son muy apolares (altos valores de  $\log K_{ow}$ ), lo que favorece su bioacumulación en los tejidos adiposos de los organismos vivos, en los que experimentan procesos de bioconcentración y biomagnificación una vez que ingresan en las cadenas tróficas.

La primera síntesis de PCBs fue realizada por Schmitt-Schulz en Alemania en 1881, iniciándose su producción a nivel industrial por la empresa Monsanto en 1929. Como principales aplicaciones se pueden mencionar su uso como intercambiadores de calor y fluidos dieléctricos en sistemas eléctricos, como transformadores o estaciones rectificadoras, como modificadores de aceite (adelgazadores), como fluido de intercambio de calor y en bombas de vacío. También como impregnadores de resistencias de carbón y como selladores en agentes impregnantes para sistemas eléctricos [230]. En principio, estos compuestos fueron bienvenidos a nivel industrial debido a su alta estabilidad térmica y a su no inflamabilidad, por lo cual su uso se generalizó rápidamente.

Los PCBs coplanares tienen una mayor importancia medioambiental y analítica debido a su toxicidad, parecida a la de las dibenzodioxinas policloradas (PCDDs) y dibenzofuranos policlorados (PCDFs), posiblemente debido a la estructura coplanar de sus moléculas. Su toxicidad es sensiblemente mayor que la de los PCBs no coplanares. Además, con respecto a su determinación analítica, existe la dificultad añadida de su baja concentración con respecto al resto de PCBs no coplanares. Por ejemplo, en una mezcla comercial de PCBs, los coplanares pueden representar sobre un 5% o menos del total.

Debido a su amplia difusión ambiental, se han encontrado PCBs en los diferentes compartimentos medioambientales [142, 145, 146, 173, 231-237], así como en muestras biológicas de sangre, suero, tejido adiposo (humano y animal) y otros órganos con contenido graso como el cerebro y el hígado [144, 238-242].

Aproximadamente el 25% de los PCBs asimilados por el ser humano ingresa al organismo por inhalación y el 75% restante a través de productos alimenticios, siendo los de origen animal (generalmente animales marinos) la fuente más importante. La entrada en la cadena alimenticia se da en el mar, cuando el plancton puede asimilar PCBs desde los sedimentos marinos. Como ocurre con la mayoría de contaminantes, mediante el proceso de biomagnificación se va incrementando la concentración de PCBs a lo largo de la cadena alimenticia (plancton, marisco, pescado pequeño, mamíferos marinos), y usualmente el hombre, al ser el último eslabón de la cadena, es el que recibe mayores cantidades de PCBs. Debido al origen

marino, la principal fuente de ingestión de PCBs en la dieta humana es el pescado en general y especialmente el expuesto a mayores concentraciones, el cual puede llegar a ser el 4-5% del total [243].

Los PCBs, una vez ingeridos, se acumulan principalmente en tejidos ricos en lípidos, como puede ser el tejido adiposo, el cerebro, hígado, etc. Se produce una transferencia de la madre al feto durante la gestación, dan lugar a una ralentización del neurodesarrollo y afectan a la función tiroidea al situarse en receptores específicos para estas hormonas [244, 245]. Algunos estudios sugieren la posibilidad de efectos adversos incluso en niveles no tóxicos para el resto de la población adulta. Los PCBs presentan numerosos efectos toxicológicos sobre la salud humana, destacando su carácter carcinogénico [246].

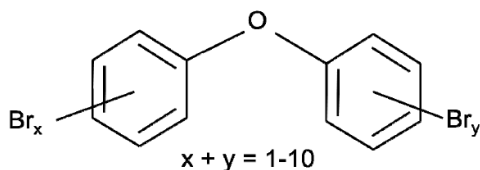
Los PCBs están incluidos en la lista de contaminantes orgánicos persistentes del Convenio de Estocolmo. Por lo tanto, y atendiendo al Reglamento 850/2004, en la Unión Europea [247] están prohibidas la producción, comercialización y uso de los PCBs solos, en preparados, o como constituyentes de materiales. Además de esta, existen otras directivas que regulan los niveles máximos permitidos de estos compuestos en alimentos destinados al consumo animal y humano [248, 249].

### **3.3. Difeniléteres polibromados, PBDEs**

Los difeniléteres polibromados, PBDEs (polybrominated biphenyls ethers) son una familia de compuestos organobromados, compuesta por una serie de 209 congéneres, los cuales están formados por dos anillos bencénicos unidos por un grupo éter [Figura 11]. Su fórmula empírica es  $C_{12}H_{10-n}Br_nO$  siendo  $n = x+y$ , y con  $n$  comprendido entre 1 y 10. Al igual que los PCBs se clasifican en diez grupos de homólogos, caracterizados por una misma masa molecular pero con diferente disposición espacial y se utiliza la nomenclatura "BZ" que le asigna un número del 1 al 209 a cada uno de los congéneres. [Tabla 3].

Los PBDEs son moléculas poco solubles en agua, sobretodo en el caso de los congéneres más bromados. Presentan altos coeficientes de partición octanol/agua ( $\log K_{ow}$ ) aumentando este valor con el grado de bromación de la molécula. Asimismo, los PBDEs presentan una baja presión de vapor, elevada estabilidad térmica, resistencia a la exposición ultravioleta y a la acción de los microorganismos. Presentan una resistencia elevada a ácidos, bases y otros agentes corrosivos, lo que justifica su elevada persistencia medioambiental. Son altamente lipófilos por lo que se

acumulan en los tejidos adiposos de los organismos vivos y al igual que los PCBs experimentan procesos de bioconcentración y biomagnificación una vez que ingresan en las cadenas tróficas [250].



**Figura 11.** Estructura general de los difeniléteres polibromados (PBDEs).

Los PBDEs empiezan a comercializarse a finales de los años 70, aumentando su producción a varios miles de toneladas a principios de este siglo. Se trata de compuestos sintetizados industrialmente y que se utilizan como aditivos en diversos materiales poliméricos, con objeto de reducir su inflamabilidad e inhibir su probabilidad de ignición. Sus aplicaciones son muy diversas, por su gran eficacia como agentes ignífugos y su bajo coste. Entre ellas se encuentran, el uso en equipos eléctricos y electrónicos, productos de tipo textil o materiales de construcción, etc [251]. Sin embargo, al contrario que en el caso de los PCBs, no todos los congéneres de PBDEs han sido producidos a nivel industrial, siendo las denominadas mezclas penta-, octa- y deca-bromadas las más comunes. La primera de ellas contiene principalmente los congéneres tetra-, penta- y hexabromados (en una proporción aproximada: 32%-60%-8%), la segunda contiene los congéneres hexa-, hepta-, octa- y nonabromados (en una proporción aproximada: 12%-43%-35%-10%) y, finalmente, la mezcla deca-BDE que, prácticamente, solo contiene el congénere 209 (97%) [252, 253].

Su uso extensivo en los últimos años ha provocado su difusión en el medio ambiente, de forma que se han hallado trazas de congéneres de PBDEs en diversas matrices ambientales [141, 254-259], así como en muestras de organismos marinos [260-263] y fluidos biológicos como sangre o tejido adiposo humano [141, 264-270].

**Tabla 3.** Nomenclatura y propiedades físico-químicas de los PBDEs.

Grupo de homólogos	Peso molecular	Número de isómeros (Nº nomenclatura IUPAC)	Presión de vapor (Pa)	Solubilidad en agua (g/m <sup>3</sup> )	Log K <sub>ow</sub> <sup>†</sup>
Monobromados	249,1	3 (1-3)	1,115	0,176	4,2
Dibromados	320,0	12 (4-15)	0,271	0,130	5,7
Tribromados	399,9	24 (16-39)	0,034	0,028	5,9
Tetrabromados	485,8	42 (40-81)	2,9 x 10 <sup>-3</sup>	0,018	6,8
Pentabromados	559,7	46 (82-127)	1,6 x 10 <sup>-4</sup>	6,0 x 10 <sup>-3</sup>	7,2
Hexabromados	639,6	42 (128-169)	4,5 x 10 <sup>-5</sup>	1,0 x 10 <sup>-3</sup>	7,8
Heptabromados	719,5	24 (170-193)	7,3 x 10 <sup>-6</sup>	9,3 x 10 <sup>-4</sup>	8,3
Octabromados	799,4	12 (194-205)	8,6 x 10 <sup>-6</sup>	6,9 x 10 <sup>-4</sup>	9,0
Nonabromados	879,3	3 (206-208)	3,9 x 10 <sup>-6</sup>	6,5 x 10 <sup>-4</sup>	11,1
Decabromados	959,2	1 (209)	4,6 x 10 <sup>-6</sup>	7,6 x 10 <sup>-4</sup>	12,6

<sup>†</sup>K<sub>ow</sub> : Coeficiente de reparto octanol-agua.

No existen para los PBDEs tanta información referente a su toxicidad en los seres vivos como la que existe para los PCBs. Sin embargo, existen bastantes trabajos de investigación que demuestran sus efectos tóxicos [250]. Por ejemplo, se conoce su actividad como disruptores endocrinos de todas las mezclas comerciales [271, 272]. Además, llegan a alterar las funciones hepáticas debido a desequilibrios en la producción de hormonas tiroideas y de vitamina A [273, 274]. La mezcla penta-BDE también parece influir en el desarrollo del aparato reproductor [275, 276]. En el periodo de gestación los PBDEs provocan efectos similares a los observados para los PCBs, con alteraciones en el desarrollo intelectual y, además, disfunciones neurológicas [277-279]. Por último, aunque se han observado efectos carcinogénicos en animales para la mezcla deca-BDE, los datos referentes a humanos son aún escasos [280].

Demostrados los efectos tóxicos de varios congéneres de PBDEs, las mezclas tetra-, penta-, hexa- y heptabromadas fueron incluidas en el anexo A del Convenio de Estocolmo en 2009 de forma que se insta a que su uso y producción sean eliminados de los procesos industriales [3]. La EU en base a los estudios realizados sobre la presencia y toxicidad de estos compuestos [281] establece en 2005 una directiva para reducir su contenido máximo en equipos eléctricos y electrónicos, estableciendo un valor máximo del 0,1% del peso del material [282].

### **3.4. Hidrocarburos halogenados**

El término halogenado se refiere a la composición o mezcla química que contiene átomos de halógeno, es decir flúor, cloro, bromo o yodo. En el enlace con el carbono, los halógenos forman un tipo de compuestos llamados halogenuros covalentes, haloalcanos (hidrocarburos halogenados), o haluros de alquilo.

Los hidrocarburos halogenados incluyen los halometanos, haloetanos y bencenos halogenados. De entre los más importantes cabe citar el cloroformo, el clorobenceno, el tricloroetileno, el tetracloruro de carbono, el cloruro de metileno (diclorometano), el tetracloroetileno (percloroetileno), 1,1,1-tricloroetano (metilcloroformo, cloroetano) , y los formados por otros halógenos junto al cloro como los fluocarburos clorados (CFCs), el clorodibromometano y el diclorobromometano. Entre los hidrocarburos bromados se puede destacar el bromoformo. Existen muchos usos industriales y comerciales para los hidrocarburos halogenados debido a su excelente capacidad para disolver aceites, su rápida evaporación y su estabilidad química.

Históricamente, los primeros disolventes halogenados utilizados fueron los disolventes hidrocarbonados, tipo alcoholes o derivados del petróleo, debido a que eran los más económicos. A estos productos los sustituyeron los clorocarbonos, que proporcionaron una mejora en seguridad al no ser inflamables. Sin embargo, estudios posteriores revelaron su toxicidad y, por ello se propusieron los clorofluorocarbonos (CFCs) que, en un principio, no eran considerados tóxicos, ni inflamables y además no eran agresivos con los plásticos. Hasta esa fecha no había nada parecido, eran productos revolucionarios tanto en gas como en líquido. Así, a finales de los años setenta las investigaciones científicas pusieron en duda las propiedades medioambientales de los CFCs y surgen los primeros indicios acerca de su contribución a la destrucción de la capa de ozono, y en consecuencia, se planificó la retirada del mercado mediante un acuerdo de las Naciones Unidas conocido como Protocolo de Montreal [283]. La corta permanencia en la atmósfera y su uso masivo han provocado que se vuelvan a utilizar como disolventes productos altamente clorados como el tricloroetileno, tetracloroetileno y diclorometano e incluso productos bromados como el bromoformo. Estos productos clorados tradicionales son, sin embargo, tóxicos y parcialmente causantes de la eliminación del Ozono.

La cloración del agua potable provoca la difusión de gran parte de este tipo de compuestos en el medioambiente y la exposición directa de los seres humanos. En el agua de bebida se pueden encontrar de 1 a 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  para bromoformo y

dibromoclorometano, y  $44 \mu\text{g L}^{-1}$  para cloroformo, concentraciones que parecen no tener efectos adversos para la salud [284, 285]. Sin embargo, estudios en animales han demostrado que altas dosis de compuestos como el bromoformo y el dibromoclorometano pueden causar daños en el hígado o el riñón, así como la depresión del sistema nervioso central. No se conocen en la actualidad relación entre estos compuestos y efectos en el desarrollo del feto en animales o mujeres embarazadas, ni de efectos carcinogénicos. En el caso del cloroformo, existen evidencias de daños en el cerebro, hígado y riñón humanos, así como estudios que lo relacionan con varios tipos de cáncer como el cáncer de colon. La agencia internacional para la investigación del cáncer (IARC) lo ha clasificado como posible carcinogénico para los seres humanos [284, 285].

En el caso del tri- y tetracloroetileno su emisión al medioambiente es debida, principalmente, por su uso a nivel industrial como disolventes. Son bastante volátiles por lo que sus concentraciones en agua son menores que la de otros haloalcanos. Presentan una toxicidad elevada en el ser humano cuando es expuesto a los vapores de estos dos disolventes. Se han detallado efectos leves como mareos, somnolencia, náuseas o dolor de cabeza con exposiciones moderadas. Los efectos a niveles de exposición altos incluyen daños en el hígado o el riñón y arritmias de corazón, siendo letal en condiciones de exposición extrema. No se dispone de evidencias científicas que relacionen estos compuestos con cualquier tipo de cáncer en humanos, aunque estudios en animales parecen indicar que pueden ser causantes de cáncer en los pulmones, hígado y testículos. Basándose en estos datos la IARC los ha clasificado como posibles carcinogénicos para los seres humanos [286, 287].

En cuanto a su regulación, existen directivas europeas referidas al control de emisiones industriales de compuestos orgánicos volátiles [288] y a la seguridad de los trabajadores en el ambiente laboral que limitan las emisiones de algunos disolventes halogenados como el tricloroetileno [289]. En cuanto a su presencia en productos alimenticios, existen algunas normativas generales que establecen límites máximos en el agua de bebida [290], en colorantes alimenticios [291] o en el aceite de oliva [292].

### 3.5. Fármacos y sus productos de degradación

Los productos farmacéuticos son sustancias químicas sintéticas o naturales utilizadas en medicina y veterinaria para el diagnóstico, cura, tratamiento y prevención de enfermedades. En la actualidad se producen cientos de toneladas al año de estos compuestos en diferentes formulaciones [293, 294]. Se clasifican en familias de acuerdo a su función y actividad biológica, por ejemplo, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, antibióticos,  $\beta$ -bloqueadores, antidepresivos, antiepilépticos, antisépticos, hormonas esteroideas o sedantes [295].

Una vez en el organismo, una parte de estos productos farmacéuticos realizan su actividad biológica siendo metabolizados, mientras que otra parte no entran en las rutas metabólicas y son excretados al medio en su forma original. Por tanto, se produce una liberación al medioambiente de productos farmacéuticos con una alta actividad biológica que, bien en su forma original, o bien los metabolitos derivados de los procesos naturales de degradación de estos productos, causan un importante efecto contaminante en el ecosistema [295-298]. Además de ello, una parte importante de los productos farmacéuticos producidos no son consumidos en las fechas recomendadas por los fabricantes y los usuarios se deshacen de ellos, en gran medida, a través del desagüe de sus hogares. Todos estos compuestos desechados entran en las aguas residuales de los núcleos urbanos y son conducidos a las plantas de tratamiento de aguas, donde son degradados en un alto porcentaje. Sin embargo, en muchas ocasiones los productos de degradación que se obtienen en esos procesos de tratamiento son biológicamente más activos y tóxicos que los compuestos originales, lo que supone un problema medioambiental cada vez más importante [296-299].

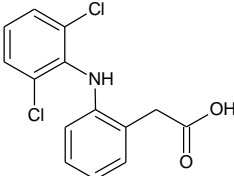
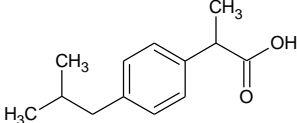
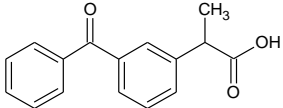
Los fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) son los productos farmacéuticos de venta libre más utilizados en aplicaciones médicas humanas y veterinarias de todo el mundo. Además, los NSAIDs son uno de los grupos de fármacos más frecuentemente detectados en los ambientes acuáticos en los niveles de concentración de  $\mu\text{g L}^{-1}$  en agua superficial, agua potable y aguas residuales [133-137, 300, 301].

Los NSAIDs tienen propiedades analgésicas, antipiréticas y anti-inflamatorias, reduciendo la inflamación y el dolor por la inhibición de las ciclooxigenasas *COX-1* y *COX-2*, que son enzimas que catalizan la síntesis de prostaglandinas, que se encargan de estimular las terminaciones nerviosas del dolor [302, 303]. Algunos de los fármacos más importantes de este grupo son el Ibuprofeno (IBP), el diclofenac

(DFC) o el ketoprofeno (KTP). Estos compuestos tienen carácter ácido, son no volátiles y solubles en agua [Tabla 5].

En muchos casos, las consecuencias de la presencia de los NSAIDs en el medio ambiente no están aún claras, pero en otros casos se ha demostrado su toxicidad y daño al ecosistema [295, 304]. Por tanto, la legislación referente a la regulación de este tipo de compuestos en el medio ambiente o los alimentos de consumo humano no es todavía lo suficientemente extensa y restrictiva. Para ello, son necesarios nuevos estudios sobre la presencia de NSAIDs en muestras medioambientales, biológicas y de alimentos, así como de los productos de degradación formados en los procesos (bio)químicos en los que intervienen.

**Tabla 4.** Propiedades físico-químicas de algunos NSAIDs.

Fármaco	Estructura	Peso molecular	pKa	Solubilidad en agua (g/m <sup>3</sup> )	Log K <sub>ow</sub> <sup>†</sup>
Diclofenac		296,15	4,15	2,37	4,51
Ibuprofeno		206,3	4,91	21	3,97
Ketoprofeno		254,28	4,45	51	3,12

<sup>†</sup> K<sub>ow</sub> : Coeficiente de reparto octanol-agua.

**Referencias**

- [1] Valcarcel, M., Trends in analytical chemistry, 16 (1997) 124-131.
- [2] Meyer, V. R., Majors, R. E., LC/LG Europe July (2002) 2-5.
- [3] UNEP, Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants.  
<http://chm.pops.int/>.
- [4] WHO, Contaminantes orgánicos (cuarta parte)  
<http://www.bvsde.ops-oms.org/bvstox/fulltext/toxico/toxico-04a18.pdf>.
- [5] UNEP-POPS-COP.5-INF-27.English. Proyecto de orientación sobre el plan de monitoreo global de contaminantes orgánicos persistentes. PNUMA, Marzo 2011.
- [6] Kefeni, K.K., Okonkwo, J.O., Chemosphere, 87 (2012) 1070-1075.
- [7] González-Gago, A., Marchante-Gayon, J.M., Alonso, J.I.G., Anal. Chem., 83 (2011) 3024-3032.
- [8] Luque-García, J.L., Luque de Castro, F M.D., Trends Anal. Chem., 22 (2003) 41-47.
- [9] Bendicho, C., De La Calle, I., Pena, F., Costas, M., Cabaleiro, N., Lavilla I., Trends Anal. Chem., 31 (2012) 50-60.
- [10] Seidi, S., Yamini, Y, Cent. Eur. J. Chem., 10 (2012) 938-976.
- [11] Tadeo, J. L., Sánchez-Brunete, C., Alberro, B., García-Valcárcel, A. I., J. Chromatogr. A, 1217 (2010) 2415-2440.
- [12] Chan, C.-H., Yusoff, R., Ngoh, G.-C., Kung, F.W.-L., J. Chromatogr. A, 1218 (2011) 6213-6225.
- [13] Hu, X.G., Zhou, Q.X., Chromatographia, 74 (2011) 489-495.
- [14] Xu, H.Y., Wang, T.Y., Zhao, Q., Zeng, Q.L., Wang, H., Xu, Y., Zhang, X.P., Wang, Ding, F., L., Chromatographia, 74 (2011) 267-274.
- [15] Itoh, N., Fushimi, A., Yarita, T., Aoyagi, Y., Numata, M., Anal. Chim. Acta, 699 (2011) 49-56.
- [16] Li, Y.P., Skouroumounis, G.K., Elsey, G.M., Taylor, D.K., Food Chem., 129 (2011) 570-576.
- [17] Mascolo, G., Locaputo, V., Mininni, G., J. Chromatogr. A, 1217 (2010) 4601-4611.
- [18] Losada, S., Parera, J., Abalos, M., Abad, E., Santos, F.J., Galceran, M.T., Anal. Chim. Acta, 678 (2010) 73-81.
- [19] Subedi, B., Usenko, S., J. Chromatogr. A, 1238 (2012) 30-37.
- [20] Cocco, E., Guignard, C., Hoffmann, L., Bohn, T., Int. J. Environ. Anal. Chem., 91 (2011) 333-347.
- [21] Malavia, J., Santos, F.J., Galceran, M.T., Talanta, 84 (2011) 1155-1162.
- [22] Mustafa, A., Turner, C., Anal. Chim. Acta, 703 (2011) 8-18.

- [23] Herrero, M., Castro-Puyana, M., Mendiola, J. A., Ibáñez, E., Trends Anal. Chem., 43 (2013) 67-83.
- [24] Herrero, M., Mendiola, J. A., Cifuentes, A., Ibáñez, E., J. Chromatogr. A, 1217 (2010) 2495–2511
- [25] Calvosa, F.C., Lagalante, A.F., Talanta, 80 (2010) 1116-1120.
- [26] Liu, W.L., Hwang, B.H., Li, Z.G., Jen, J.F., Lee, M.R., J. Chromatogr. A, 1218 (2011) 7857-7863.
- [27] Baker, S. A., J. Biochem. Biophys. Methods, 70 (2007) 151-162.
- [28] Capriotti, A. L., Cavaliere, C., Giansanti, P., Gubbiotti, R., Samperi, R., Laganà, A., J. Chromatogr. A, 1217 (2010) 2521-2532.
- [29] Capriotti, A. L., Cavaliere, C., Laganà, A., Piovesana, S., Samperi, R., Trends Anal. Chem., 43 (2013) 53-66.
- [30] Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Stajnbaher, D., Schenck, F. J., J. AOAC Int., 86 (2003) 412-431.
- [31] Majors, R.E., LC-GC Eur., 20 (2007) 574-581.
- [32] Wilkowska, A., Biziuk, M., Food Chem., 125 (2011) 803-812.
- [33] Pereira, R., de Freitas, E.E., de Alkimim, J.F., Azevedo, E., Vasconcellos, D., Augusti, R., Food Control, 28 (2012) 192-198.
- [34] Omar, N., Bakar, J., Muhammad, K., Food Control, 34 (2013) 318-322.
- [35] Hou, X.-L., Wu, Y.-L., Chen, R.-X., Zhu, Y., Lv, Y., Xu, X.-Q., J. Pharm. Biomed. Anal., 88 (2014) 53-59.
- [36] Ramautar, R., Somsen, G. W., de Jong, G. J., Electrophoresis, 31 (2010) 44-54.
- [37] Yang, F. X., Jin, S. W., Meng, D. Y., Xu, Y., Chemosphere, 81 (2010) 1000-1005.
- [38] Ullah, S., Alsberg, T., Berger, U., J. Chromatogr. A, 1218 (2011) 6388-6395.
- [39] Drabova, L., Tomaniova, T., Kalachova, K., Kocourek, V., Hajslova, J., Pulkrabova, J., Food Control, 33 (2013) 489-497.
- [40] Martins, M. L., Donato, F. F., Prestes, O. D., Adaime, M. B., Zanella, R., Anal. Bioanal. Chem., 405 (2013) 7697-7709.
- [41] Sajid, M., Na, N., Safdar, M., Lu, X., Ma, L., He, L., Ouyang, J., J. Chromatogr. A, 1314 (2013) 173-179.
- [42] Augusto, F., Hantao, L. W., Mogollón, N. G. S., Braga, S. C. G. N., Trends Anal. Chem., 43 (2013) 14-23.
- [43] Arthur, C., Pawliszyn, J., Anal. Chem., 62 (1990) 2145-2148.
- [44] Risticvic, S., Niri, V. H., Vuckovic, D., Pawliszyn, J., Anal. Bioanal. Chem., 393 (2009) 781-795.
- [45] Vuckovic, D., Zhang, X., Cudjoe, E., Pawliszyn, J., J. Chromatogr. A, 1217 (2010) 4041-4060.
- [46] Duan, C., Shen, Z., Wu, D., Guan, Y., Trends Anal. Chem., 30 (2011) 1568-1574.

- [47] Souza-Silva, E. A., Risticcevic, S., Pawliszyn, J., Trends Anal. Chem., 43 (2013) 24-36.
- [48] Spietelun, A., Kloskowski, A., Chrzanowski, W., Namieśnik, J., Chem. Rev., 113 (2013) 1667-1685.
- [49] Sarafraz-Yazdi, A., Amiri, A., Trends Anal. Chem., 29 (2010) 1-14.
- [50] Mahugo-Santana, C., Sosa-Ferrera, Z., Torres-Padrón, M. E., Santana-Rodríguez, J. J., Trends Anal. Chem., 30 (2011) 731-748.
- [51] Asensio-Ramos, M., Ravelo-Pérez, L. M., González-Curbelo, M. A., Hernández-Borges, J., J. Chromatogr. A, 1218 (2011) 7415-7437.
- [52] Rezaee, M., Assadi, Y., Milani-Hosseini, M. R., Aghaee, E., Ahmadi, F., Berijani, S., J. Chromatogr. A, 1116 (2006) 1.
- [53] Herrera-Herrera, A. V., Asensio-Ramos, M., Hernández-Borges, J., Rodríguez-Delgado, M. A., Trends Anal. Chem., 29 (2010) 728-751.
- [54] Bosch-Ojeda, C., Sánchez-Rojas, F., Chromatographia, 74 (2011) 651-679.
- [55] Andruch, V., Kocúrová, L., Balogh, I. S., Škrliková, J., Microchem. J., 102 (2012) 1-10.
- [56] Jeannot, M. A., Przyjazny, A., Kokosa, J. M., J. Chromatogr. A, 1217 (2010) 2326-2336.
- [57] Pakade, Y. B., Tewary, D. K., J. Sep. Sci., 33 (2010) 3683-3691.
- [58] Alothman, Z. A., Dawod, M., Kim, J., Chung, D. S., Anal. Chim. Acta, 739 (2012) 12-24.
- [59] Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K. E., Anal. Chem., 71 (1999) 2650-2656.
- [60] Audunsson, G. A., Anal. Chem., 58 (1986) 2714-2723.
- [61] Jönsson, J. Å., Mathiasson, L., Trends Anal. Chem., 11 (1992) 106-114.
- [62] Lindegård, B., Björk, H., Jönsson, J. Å., Mathiasson, L., Olsson, A. M., Anal. Chem., 66 (1994) 4490-4497.
- [63] Ma, M., Cantwell, F. F., Anal. Chem., 70 (1998) 3912-3919.
- [64] Mayer, P., Tolls, J., Hermens, J. L. M., Mackay, D., Environ. Sci. Technol., 37 (2003) 184A-191A.
- [65] Jönsson, J. Å., Lövkvist, P., Audunsson, G., Nilvé, G., Anal. Chim. Acta, 227 (1993) 9-24.
- [66] Lezamiz, J., Jönsson, J. Å., J. Chromatogr. A, 1152 (2007) 226-233.
- [67] de Jager, L. S., Andrews, A. R. J., Analyst, 126 (2001) 1298-1303.
- [68] Vora-adisak, N., Varanusupakul, R., J. Chromatogr. A, 1121 (2006) 236-241.
- [69] Jiang, X., Lee, H. K., Anal. Chem., 76 (2004) 5591-5596.
- [69] Siang, G. H., Makahleh, A., Saad, B., Lim, B. P., J. Chromatogr. A, 1217 (2010) 8073-8078.
- [70] Wu, J., Lee, H. K., J. Chromatogr. A, 1133 (2006) 13-20.

- [71] Saaid, M., Saad, B., Ali, A. S. M., Saleh, M. I., Basheer, C., Lee, H. K., J. Chromatogr. A, 1216 (2009) 5165-5170.
- [72] Chia, K.-J., Huang, S.-D., J. Chromatogr. A, 1103 (2006) 158-161.
- [73] Kamarei, F., Ebrahimpzadeh, H., Yamini, Y., J. Hazard. Mater., 178 (2010) 747-752.
- [74] Sarafraz-Yazdi, A., Es'haghi, Z., J. Chromatogr. A, 1082 (2005) 136-142.
- [75] Zhao, L., Zhu, L., Lee, H. K. J., Chromatogr. A, 963 (2002) 239-248.
- [76] Saraji, M., Mousavi, F., Food Chem., 123 (2010) 1310-1317.
- [77] Liu, J.-F., Hu, X.-L., Peng, J.-F., Jönsson, J. Å., Mayer, P., Jiang, G.-B., Anal. Chem., 78 (2006) 8526-8534.
- [78] Ito, R., Kawaguchi, M., Honda, H., Koganei, Y., Okanouchi, N., Sakui, N., Saito, K., Nakazawa, H., J. Chromatogr. B, 872 (2008) 63-67.
- [79] Zhao, R.-S., Yuan, J.-P., Li, H.-F., Wang, X., Jiang, T., Lin, J.-M., Anal. Bioanal. Chem., 387 (2007) 2911-2915.
- [80] Liu, J. F., Jönsson, J. Å., Mayer, P., Anal. Chem., 77 (2005) 4800-4809.
- [81] Peng, J. F., Liu, J. F., Hu, X. L., Jiang, G. B., J. Chromatogr. A, 1139 (2007) 165-170.
- [82] Almeda, S., Nozal, L., Arce, L., Valcarcel, M., Anal. Chim. Acta, 587 (2007) 97-103.
- [83] Ghambarian, M., Yamini, Y., Esrafil, A., Yazdanfar, N., Moradi, M. J., Chromatogr. A, 1217 (2010) 5652-5658.
- [84] Jiang, X., Oh, S. Y., Lee, H. K., Anal. Chem., 77 (2005) 1689-1695.
- [85] Feng, Y. D., Tan, Z. Q., Liu, J. F., J. Sep. Sci., 34 (2011) 965-970.
- [86] Lin, C. Y., Huang, S. D., J. Chromatogr. A, 1193 (2008) 79-84.
- [87] Lai, B. W., Liu, B. M., Malik, P. K., Wu, H. F., Anal. Chim. Acta, 576 (2006) 61-66.
- [88] Chung, L. W., Lee, M. R., Talanta, 76 (2008) 154-160.
- [89] Bartolomé, L., Lezamiz, J., Etxebarria, N., Zuloaga, O., Jönsson, J. Å., J. Sep. Sci., 30 (2007) 2144-2152.
- [90] Hansson, H., Colmsjö, A., Nilsson, U., J. Sep. Sci., 33 (2010) 112-119.
- [91] Hansson, H., Nilsson, U., Talanta, 77 (2009) 1309-1314.
- [92] Berhanu, T., Liu, J. F., Romero, R., Megersa, N., Jönsson, J. Å., J. Chromatogr. A, 1103 (2006) 1-8.
- [93] Sanagi, M. M., Miskam, M., Ibrahim, W. A. W., Hermawan, D., Aboul-Enein, H. Y., J. Sep. Sci., 33 (2010) 2131-2139.
- [94] Zhu, L., Lee, H. K., J. Chromatogr. A, 924 (2001) 407-414.
- [95] Bishop, E. J., Mitra, S., Anal. Chim. Acta, 583 (2007) 10-14.
- [96] Sarafraz-Yazdi, A., Amiri, A. H., Es'haghi, Z., Chemosphere, 71 (2008) 671-676.
- [97] Basheer, C., Alnedhary, A. A., Madhava-Rao, B. S., Balasubramanian, R., Lee, H. K., J. Chromatogr. A, 1210 (2008) 19-24.

- [98] Chen., Y. C., Wu, H. F., *J. Sep. Sci.*, 32 (2009) 3013-3019.
- [99] Ouyang, G., Zhao, W., Pawliszyn, J., *J. Chromatogr. A*, 1138 (2007) 47-54.
- [100] Charalabaki, M., Psillakis, E., Mantzavinos, D., Kalogerakis, N., *Chemosphere*, 60 (2005) 690-698.
- [101] King, S., Meyer, J. S., Andrews, A. R. J., *J. Chromatogr. A*, 982 (2002) 201-208.
- [102] Jiang, X., Basheer, C., Zhang, J., Lee, H. K., *J. Chromatogr. A*, 1087 (2005) 289-294.
- [103] Marlow, M., Hurtubise, R. J., *Anal. Chim. Acta*, 526 (2004) 41-49.
- [104] Hyder, M., Luque-Aguilar, L., Genberg, J., Sandahl, M., Wesén, C., Jönsson, J. Å. *Talanta*, 85 (2011) 919-926.
- [105] Kuosmanen, K., Hyötyläinen, T., Hartonen, K., Riekkola, M. L., *Analyst*, 128 (2003) 434-439.
- [106] Hylton, K., Sangwan, M., Mitra, S., *Anal. Chim. Acta*, 653 (2009) 116-120.
- [107] Shariati, S., Yamini, Y., Esrafil, A., *J. Chromatogr. B*, 877 (2009) 393-400.
- [108] Cui, S., Tan, S., Ouyang, G., Pawliszyn, J., *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 2241-2247.
- [109] Müller, S., Möder, M., Schrader, S., Popp, P., *J. Chromatogr. A*, 985 (2003) 99-106.
- [110] Basheer, C., Lee, H. K., *J. Chromatogr. A*, 1057 (2004) 163-169.
- [111] Kawaguchi, M., Ito, Okanouchi, N., Saito, K., Nakazawa, H., *J. Chromatogr. B*, 870 (2008) 98-102.
- [112] Liu, M., Qiu, B., Jin, X., Zhang, L., Chen, X., Chen, G., *J. Sep. Sci.*, 31 (2008) 622-628.
- [113] Poliwoda, A., Krzyzak, M., Wieczorek, P. P., *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 3590-3597.
- [114] Ramos-Payán, M., Bello-López, M. A., Fernández-Torres, R., González, J. A. O., Callejón-Mochón, M., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 55 (2011) 332-341.
- [115] Zorita, S., Hallgren, P., Mathiasson, L., *J. Chromatogr. A*, 1192 (2008) 1-8.
- [116] Ho, T. S., Halvorsen, T. G., Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K. E., *J. Chromatogr. A*, 998 (2003) 61-72.
- [117] Halvorsen, T. G., Pedersen-Bjergaard, S., Reubsæet, J. L. E., Rasmussen, K. E., *J. Sep. Sci.*, 24 (2001) 615-622.
- [118] Esrafil, A., Yamini, Y., Shariati, S., *Anal. Chim. Acta*, 604 (2007) 127-133.
- [119] Zorita, S., Barri, T., Mathiasson, L., *J. Chromatogr. A*, 1157 (2007) 30-37.
- [120] Raich-Montiu, J., Krogh, K. A., Granados, M., Jönsson, J. Å., Halling-Sorensen, B. J., *Chromatogr. A*, 1187 (2008) 275-280.
- [121] De Freitas, D. F., Dobrovolskin-Porto, C. E., Pizzamiglio-Vieira, E., Pereira-Bastos de Siqueira, M. E., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 51 (2010) 170-177.

- [122] Bjørhovde, A., Halvorsen, T. G., Rasmussen, K. E., Pedersen-Bjergaard, S., *Anal. Chim. Acta* 491 (2003) 155-161.
- [123] Halvorsen, T. G., Pedersen-Bjergaard, S., Reubsaet, J. L. E., Rasmussen, K. E., *J. Sep. Sci.*, 26 (2003) 1520-1526.
- [124] Al-Azzam, K. M., Makahleah, A., Saad, B., Mansor, M.S., *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 3654-3659.
- [125] Bårdstu, K. F., Ho, T. S., Halvorsen, T. G., Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K. E., *J. Sep. Sci.*, 30 (2007) 1364-1370.
- [126] Ho, T. S., Vasskog, T., Anderssen, T., Jensen, E., Rasmussen, K. E., Pedersen-Bjergaard, S., *Anal. Chim. Acta*, 592 (2007) 1-8.
- [127] Malagueño de Santana, F. J., Lanchote, V. L., Bonato, P. S., *Electrophor.*, 29 (2008) 3924-3932.
- [128] Zorita, S., Mårtensson, L., Mathiasson, L., *J. Sep. Sci.*, 30 (2007) 2513-2521.
- [129] Zhang, J., Lee, H. K., *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 7527-7532.
- [130] Quintana, J. B., Rodil, R., Reemtsma, T., *J. Chromatogr. A*, 1061 (2004) 19-26.
- [131] Ramos-Payán, M., Bello-López, M.Á., Fernández-Torres, R., Callejón-Mochón, M., Gómez-Ariza, J. L., *Talanta*, 82 (2010) 854-858.
- [132] Ramos-Payán, M., Bello-López, M.Á., Fernández-Torres, R., Villar Navarro, M., Callejón-Mochón, M., *Talanta*, 79 (2009) 911-915
- [133] Es'haghi, Z., *Anal. Chim. Acta*, 641 (2009) 83-88.
- [134] Wen, X., Tu, C., Lee, H. K., *Anal. Chem.*, 76 (2004) 228-232.
- [135] Wu, J., Lee, H. K., *J. Chromatogr. A*, 1092 (2005) 182-190.
- [136] Sagrista, E., Larsson, E., Ezoddin, M., Hidalgo, M., Salvado, V., Jönsson, J. Å., *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 6153-6158.
- [137] Saleh, A., Larsson, E., Yamini, Y., Jönsson, J. Å., *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 1331-1339.
- [138] Tao, Y., Liu, J. F., Hu, X. L., Li, H. C., Wang, T., Jiang, G. B., *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 6259-6266.
- [139] Bedendo, G.C., Jardim, I. C. S. F., Carasek, E., *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 6449-6454.
- [140] Fontanals, N., Barri, T., Bergström, S., Jönsson, J. Å., *J. Chromatogr. A*, 1133 (2006) 41-48.
- [141] Xiao, Q., Hu, B., Duan, J., He, M., Zu, W., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 18 (2007) 1740-1748.
- [142] Basheer, C., Vetrichelvan, M., Valiyaveettil, S., Lee, H. K., *J. Chromatogr. A*, 1139 (2007) 157-164.
- [143] Garcia-Lopez, M., Rodriguez, I., Cela, R., *Anal. Chim. Acta*, 625 (2008) 145-153.
- [144] Basheer, C., Lee, H. K., Obbard, J. P., *J. Chromatogr. A*, 1022 (2004) 161-169.

- [145] Bayen, S., Buffle, J., Intern. J. Environ. Anal. Chem., 89 (2009) 277-292.
- [146] Li, G., Zhang, L., Zhang, Z., J. Chromatogr. A, 1204 (2008) 119-122.
- [147] Barahona, F., Gjelstad, A., Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K. E., J. Chromatogr. A, 1217 (2010) 1989-1994.
- [148] Pan, H. J., Ho, W. H., Anal. Chim. Acta, 527 (2004) 61-67.
- [149] Piriyaipittaya, M., Jayanta, S., Mitra, S., Leepipatpiboon, N., J. Chromatogr. A, 1189 (2008) 483-492.
- [150] Melwanki, M. B., Huang, S-D., Anal. Chim. Acta, 555 (2006) 139-145.
- [151] Peng, J., Lü, J., Hu, X., Liu, J., Jiang, G., Microchim. Acta, 158 (2007) 181-186.
- [152] Hu, X., Liu, J., Jönsson, J. Å., Jiang, G., Environ. Toxicol. Chem., 28 (2009) 231-238.
- [153] Zhu, L., Ee, K. H., Zhao, L., Lee, H. K., J. Chromatogr. A, 963 (2002) 335-343.
- [154] Wu, J., Lee, H. K., Anal. Chem., 78 (2006) 7292-7301.
- [155] Liu, J. F., Toräng, L., Mayer, P., Jönsson, J. Å., J. Chromatogr. A, 1160 (2007) 56-63.
- [156] Wu, J., Ee, K. H., Lee, H. K., J. Chromatogr. A, 1082 (2005) 121-127.
- [157] Zhou, Q., Liu, J., Cai, Y., Liu, G., Jiang, G., Microchem. J., 74 (2003) 157-163.
- [158] Shen, G., Lee, H. K., Anal. Chem., 74 (2002) 648-654.
- [159] Esrafilii, A., Yamini, Y., Ghambarian, M., Moradi, M., Seidi, S., J. Sep. Sci., 34 (2011) 957-964.
- [160] Xu, L., Basheer, C., Lee, H. K., J. Chromatogr. A, 1217 (2010) 6036-6043.
- [161] Hu, Y., Wang, Y., Hu, Y., Li, G., J. Chromatogr. A, 1216 (2009) 8304-8311.
- [162] Lambropoulou, D. A., Albanis, T. A., J. Chromatogr. A, 1072 (2005) 55-61.
- [163] Jiang, X., Lee, H. K., Anal. Chem., 76 (2004) 5591-5596.
- [164] Zhang, J., Lee, H. K., J. Chromatogr. A, 1117 (2006) 31-37.
- [165] Yan, C. H., Wu, H. F., Rapid Commun. Mass Spectrom., 18 (2004) 3015-3018.
- [166] Huang, S. P., Huang, S. D., J. Chromatogr. A, 1176 (2007) 19-25.
- [167] Basheer, C., Lee, H. K., Obbard, J. P., J. Chromatogr. A, 968 (2002) 191-199.
- [168] Basheer, C., Balasubramanian, R., Lee, H. K., J. Chromatogr. A, 1016 (2003) 11-20.
- [169] Bedendo, G. C., Carasek, E., J. Chromatogr. A, 1217 (2010) 7-13.
- [170] Chia, K-J., Huang, S-D., Rapid Commun. Mass Spectrom., 20 (2006) 118-124.
- [171] Huang, S. P., Huang, S. D., J. Chromatogr. A, 1135 (2006) 6-11.
- [172] Hou, L., Shen, G., Lee, H. K., J. Chromatogr. A, 985 (2003) 107-116.
- [173] Basheer, C., Obbard, J. P., Lee, H. K., J. Chromatogr. A, 1068 (2005) 221-228.
- [174] Chen, P. S., Huang, S. D., Talanta, 69 (2006) 669-675.
- [175] Sanagi, M. M., Ghani, N. F. Y. A., Miskam, M., Ibrahim, W. A. W., Aboul-Enein, H. Y., J. Liq. Chromatogr. Related Technol., 33 (2010) 693-703.

- [176] Xie, H-Y., He, Y-Z., Gan, W-E., Fu, G-N., Li, L., Hang, F., Gao, Y., *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 3353-3359.
- [177] Ouyang, G., Pawliszyn, J., *Anal. Chem.*, 78 (2006) 5783-5788.
- [178] Basheer, C., Alnedhary, A. A., Rao, B. S. M., Lee, H. K., *Anal. Chim. Acta*, 605 (2007) 147-152.
- [179] Berhanu, T., Megersa, N., Solomon, T., Jönsson, J. Å., *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 88 (2008) 933-945.
- [180] Xiong, J., Hu, B., *J. Chromatogr. A*, 1193 (2008) 7-18.
- [181] Sanagi, M. M., Abidin, N. A. Z., Ibrahim, W. A. W., Aboul-Enein, H. Y., *Chromatographia*, 71 (2010) 461-467.
- [182] Plaza-Bolaños, P., Romero-González, R., Garrido-Frenich, A., Martínez-Vidal, J. L., *J. Chromatogr. A*, 1208 (2008) 16-24.
- [183] Trtić-Petrović, T., Dorčević, J., Dujaković, N., Kumrić, K., Vasiljević, T., Laušević, M., *Anal. Bioanal. Chem.*, 397 (2010) 2233-2243.
- [184] Hou, L., Lee, H. K., *J. Chromatogr. A*, 1038 (2004) 37-42.
- [185] Romero-González, R., Pastor-Montoro, E., Garrido-Frenich, A., Martínez-Vidal, J. L., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 20 (2006) 2701-2708.
- [186] Kou, D., Wang, X., Mitra, S., *J. Chromatogr. A*, 1055 (2004) 63-69.
- [187] Varanusupakul, P., Vora-adisak, N., Pulpoka, B., *Anal. Chim. Acta*, 598 (2007) 82-86.
- [188] Cardador, M. J., Gallego, M., *Anal. Bioanal. Chem.*, 396 (2010) 1331-1343.
- [189] Montes, R., Rodriguez, I., Rubi, E., Ramil, M., Cela, R., *J. Chromatogr. A*, 1198-1199 (2008) 21-26.
- [190] Yu, C., Liu, Q., Lan, L., Hu, B., *J. Chromatogr. A*, 1188 (2008) 124-131.
- [191] Gal, C., Nutiu, R., *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 88 (2008) 447-460.
- [192] Psillakis, E., Kalogerakis, N., *J. Chromatogr. A*, 999 (2003) 145-153.
- [193] Wu, Y., Hu, B., *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 7657-7663.
- [194] Chiang, J. S., Huang, S. D., *Talanta*, 71 (2007) 882-886.
- [195] Shrivastava, K., Patel, D. K., *Food Chem.*, 122 (2010) 314-318.
- [196] González-Peñas, E., Leache, C., Viscarret, M., Pérez de Obanos, A., Araguás, C., López de Cerain, A., *J. Chromatogr. A*, 1025 (2004) 163-168.
- [197] Romero-González, R., Garrido-Frenich, A., Martínez-Vidal, J. L., Aguilera-Luiz, M. M., *Talanta*, 82 (2010) 171-176.
- [198] Zywicki, B., Reemtsma, T., Jekel, M., *J. Chromatogr. A*, 970 (2002) 191-200.
- [199] Vora-adisak, N., Varanusupakul, P., *J. Chromatogr. A*, 1121 (2006) 236-241.
- [200] Nandi, P., Lunte, S. M., *Anal. Chim. Acta*, 651 (2009) 1-14.
- [201] Torto, N., *Chromatographia*, 70 (2009) 1305-1309.

- [202] Luque de Castro, M.D., Papaefstathiou, I., Trends Anal. Chem., 17 (1998) 41-49.
- [203] Sae-Khow, O., Mitra, S., J. Chromatogr. A, 1217 (2010) 2736-2746.
- [204] Gómez-Ariza J. L., García-Barrera, T., Lorenzo, F., Beltrán, R., J. Chromatogr. A, 1112 (2006) 133-140.
- [205] Gómez-Ariza J. L., García-Barrera, T., Lorenzo, F., J. Chromatogr. A, 1047 (2004) 313-317.
- [206] Gómez-Ariza J. L., García-Barrera, T., Lorenzo, F., J. Chromatogr. A, 1049 (2004) 147-153.
- [207] Gómez-Ariza J. L., García-Barrera, T., Lorenzo, F., J. Chromatogr. A, 1056 (2004) 139-144.
- [208] Gómez-Ariza J. L., García-Barrera, T., Lorenzo, F., J. Chromatogr. A, 1056 (2004) 243-247.
- [209] International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides. WHO [http://www.who.int/whopes/recommendations/FAO\\_WHO\\_Guidelines\\_Pesticide\\_Advertising.pdf](http://www.who.int/whopes/recommendations/FAO_WHO_Guidelines_Pesticide_Advertising.pdf).
- [210] Description of pesticides, health and safety, etc. EPA <http://www.epa.gov/pesticides/>
- [211] REGLAMENTO (CE) Nº 850/2004 del parlamento europeo y del consejo de 29 de abril de 2004 sobre contaminantes orgánicos persistentes <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2004R0850:20100826:ES:PDF>
- [212] DIRECTIVA 98/83/CE DEL CONSEJO de 3 de noviembre de 1998 relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:1998:330:0032:0054:ES:PDF>
- [213] Real decreto 140/2003 de 7 de febrero por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano <http://www.boe.es/boe/dias/2003/02/21/pdfs/A07228-07245.pdf>
- [214] National Primary Drinking Water Regulations; Fed. Reg., Part 112, 40 CFR Part 141, p. 395, US EPA, Washington, DC, 1 July 1999.
- [215] Barr, D. B., Needham, L. L., J. Chromatogr. B, 778 (2002) 5-29.
- [216] Muralidharan, S., Dhananjayan, V., Jayanth, P., Environm. Reserch, 109 (2009) 15-21.
- [217] Cleemann, M., Riget, F., Paulsen, G. B., Klungsøyr, J., Dietz, R., Sci. Total Environ., 245 (2000) 87-102.
- [218] Sarkar, S. K., Bhattacharya, B. D., Bhattacharya, A., Chatterjee, M., Alam, A., Satpathy, K. K., Jonathan, M. P., Environ. Int., 34 (2008) 1062-1071.
- [219] Favari, L., López, E., Martínez-Tabche, L., Díaz-Pardo, E., Ecotoxicol. Environ. Safety, 51 (2002) 177-186.
- [220] Longnecker, M. P., Rogan, W. J., Lucier, G., Ann. Rev. Public, 18 (1997) 211-244.

- [221] Kester, J.E., "Clinical Environmental Health and Toxic Exposures", Sullivan, J. B., Krieger, G. R. (ed.), Lippincott Williams y Wilkins (2001) Philadelphia, USA, 362-373.
- [222] Hayes W. J., "Pesticides studied in Man" Hayes WJ, Lawes E. R. (ed.), San Diego: Academic Press (1991) Baltimore, USA, 731-868.
- [223] "Límites máximos del Codex para residuos de plaguicidas", Comisión del Codex Alimentarius, Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias (Roma, Italia). <http://www.codexalimentarius.net>
- [224] Límites máximos de plaguicidas para los productos destinados a la alimentación humana o animal  
[http://europa.eu/legislation\\_summaries/food\\_safety/plant\\_health\\_checks/l21289\\_es.htm](http://europa.eu/legislation_summaries/food_safety/plant_health_checks/l21289_es.htm)
- [225] Council Directive 76/895/CEE, Official Journal of the European communities, 23/11/1976, Luxemburg.
- [226] Council Directive 86/362/CEE, Official Journal of the European communities, 24/07/1986, Luxemburg.
- [227] Council Directive 86/363/CEE, Official Journal of the European communities, 24/07/1986, Luxemburg.
- [228] Council Directive 90/642/CEE, Official Journal of the European communities, 27/11/1990, Luxemburg.
- [229] Ballschmiter, K, Zell, M., Fresenius Z. Anal. Chem., 302 (1980) 20-31.
- [230] Polychlorinated Biphenyl (PCB). EPA  
<http://www.epa.gov/epawaste/hazard/tsd/pCBS/pubs/about.htm>.
- [231] Zhang, W., Sun, Y., Wu, C., Xing, J., Li, J., Anal. Chem., 81 (2009) 2912-2920.
- [232] Gioia, R., Nizzetto, L., Lohmann, R., Dachs, J., Temme, C., Jones, K. C., Environ. Sci. Technol., 42 (2008) 1416-1422.
- [233] Davis, J. A., Hetzel, F., Oram, J. J., McKee, L., J. Environ. Res., 105 (2007) 67-86.
- [234] Frame, G. M., Cochran, J. W., Bowadt, S. S., J. High Resol. Chromatogr., 19 (1996) 657-665.
- [235] Gómara, B., González, M. J., Baos, R., Hiraldo, F., Abad, E., Rivera, J., Jiménez, B., Environ. Int., 34 (2008) 73-78.
- [236] Meharb, A. A., Wright, J., Leeks, G. J. L., Wass P. D., Owens, P. N., Wallins, D. E., Osbom, D., Sci. Total Environ., 314-316 (2003) 439-450.
- [237] Moret, I., Gambaro, A., Piazza, R., Ferrari, S., Manodori, L., Mar. Pollut. Bull., 50 (2005) 167-174.
- [238] Trocino, A., Majolini, D., Xiccatto, G., Chemosphere, 76 (2009) 250-254.
- [239] Covaci, A., de Boer, J., Ryan, J. J., Voorspoels, S., Schepens, P., Environ. Research, 88 (2002) 210-218.

- [240] Agudo, A., Goñi, F., Etxeandia, A., Vives, A., Millán, E., López, R., Amiano, P., Environ Res., 109 (2009) 620-628.
- [241] Zubero, M. B., Ibarluzea, J. M., Aurrekoetxea, J. J., Rivera, J., Parera, J., Abad, E., Chemosphere, 76 (2009) 784-791.
- [242] Leng, J. H., Kayama, F., Wang, P. Y., Nakamura, M., Nakata, T., Wang, Y., Chemosphere, 75 (2009) 634-639.
- [243] A review of selected persistent pollutants  
[http://www.who.int/ipcs/assessment/en/pcs\\_95\\_39\\_2004\\_05\\_13.pdf](http://www.who.int/ipcs/assessment/en/pcs_95_39_2004_05_13.pdf)
- [244] Rylander, L., Stromberg, U., Hagmar, L., Chemosphere, 40 (2000) 1255-1262.
- [245] Jacobson, J. L., Jacobson, S. W., N. Engl. J. Med., 335 (1996) 783-789.
- [246] Health Effects of PCBs  
<http://www.epa.gov/epawaste/hazard/tsd/pcb/pubs/effects.htm>.
- [247] REGLAMENTO (CE) Nº 850/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 29 de abril de 2004 sobre contaminantes orgánicos persistentes y por el que se modifica la Directiva 79/117/CE  
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:158:0007:0049:ES:PDF>
- [248] REGLAMENTO (CE) No 1881/2006 DE LA COMISIÓN de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios  
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:364:0005:0024:ES:PDF>
- [249] COMMISSION RECOMMENDATION of 23 August 2011 on the reduction of the presence of dioxins, furans and PCBs in feed and food. EEA  
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:218:0023:0025:EN:PDF>.
- [250] Chemical and physical information  
<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp68-c6.pdf>.
- [251] An Exposure Assessment of Polybrominated Diphenyl Ethers. EPA  
<http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?deid=210404#Download>.
- [252] Sjödin, A., Jakobsson, E., Kierkegaard, A., Marsh, G., Sellström, U., J. Chromatogr. A, 822 (2001) 83-89.
- [253] De Boer, J., Wells, D. E., Trends Anal. Chem., 25 (2006) 364-372.
- [254] Salgado-Petinal, C., García-Chao, M., Llompart, M., García-Jares, C., Cela, R., Anal. Bioanal. Chem., 385 (2006) 637-644.
- [255] Sánchez-Brunete, C., Miguel, E., Tadeo, J., J. Sep. Sci., 32 (2009) 109-117.
- [256] Wurl, O., Lam, P. K. S., Obbar, J. P., Chemosphere, 65 (2006) 1660-1666.
- [257] Oros, D. R., Hoover, D., Rodigari, F., Crane, D., Sericano, J, Environ. Sci., Technol. 39 (2005) 33-41.
- [258] De Boer, J., Werter, P. G., Van der Horst, A., Leonards, P. E. G., Environ. Pollut., 122 (2003) 63-74.

- [259] Hu, G-C., Dai, J-Y., Xu, Z-C., Luo, X-J., Cao, H., Wang, J-S., Mai, B-X., Xu, M-Q., *Environ. Int.*, 36 (2010) 309-315.
- [260] Carro, A. M., Lorenzo, R. A., Fernández, F., Phan-Tan-Luu, R., Cela, R., *Anal. Bioanal. Chem.*, 388 (2007) 1021-1029.
- [261] Cheaib, Z., Grandjean, D., Kupper, T., De Alencastro, L. F., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 82 (2009) 522-527.
- [262] Labadie, P., Alliot, F., Bourges, C., Desportes, A., Cheureuil, M., *Anal. Chim. Acta*, 675 (2010) 97-105.
- [263] Wang, Z., Ma, X., Lin, Z., Na, G., Yao, Z., *Chemosphere*, 74 (2009) 896-901.
- [264] Gómara, B., Herrero, L., González, M. J., *Anal. Chim. Acta*, 597 (2007) 121-128.
- [265] Lacorte, S., Guillamon, M., *Chemosphere*, 73 (2008) 70-75.
- [266] Lacorte, S., Ikononou, M. G., *Chemosphere*, 74 (2009) 412-420.
- [267] Toms, L. M., Bartkow, M. E., Symons, R., Paepke, O., Mueller, J. F., *Chemosphere*, 76 (2009) 173-178.
- [268] Zhu, L., Ma, B., Hites, R. A., *Environ Sci Technol.*, 43 (2009) 6963-6968.
- [269] Pulkrabová, J., Hrádková, P., Hajslová, J., Poustka, J., Nápravníková, M., Poláček, V., *Environ. Int.*, 35 (2009) 63-68.
- [270] Smeds, A., Saukko, P., *Chemosphere*, 53 (2003) 1123-1130.
- [271] Birnbaum, L. S., Staskal, D. F., *Environ. Health Perspect.*, 112 (2004) 9-17.
- [272] Richardson, V. M., Staskal, D. F., Ross, D. G., DeVito M. J., Birnbaum, L. S., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 226 (2008) 224-250.
- [273] Ellis-Hutchings, R. G., Cherr, G. N., Hanna, L. A. Keen, C. L., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 215 (2006) 135-143.
- [274] Meets, I. A. T. M., Letcher, R. J., Hoving, S., Marsh, G., Bergman, Å., Lemmen, J. G., Van der Burg, B., Brouwer, A., *Environm. Int.*, 29 (2001) 665-682.
- [275] Lilienthal, H., Hack, A., Roth-Harer, A., Grande, S. W., Talsness, C. E., *Environ. Health Perspect.*, 114 (2006) 194-201.
- [276] Stoker, T. E., Cooper, R. L., Lambright, C. S., Wilson, V. S., Furr, J., Gray, L. E., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 207 (2005) 78-88.
- [277] Viberg, H., Fredriksson, A., Eriksson, P., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 192 (2003) 95-106.
- [278] Viberg, H., Fredriksson, A., Jakobsson, E., Orn, U., Eriksson, P., *Toxicol., Sci.* 76 (2003) 112-120.
- [279] Costa L., Giordano G., *Neurotoxicology*, 28 (2007) 1047-1067.
- [280] Birnbaum, L. S., Cohen Hubal, E. A., *Health Perspect.*, 114 (2006) 1770-1775.
- [281] Scientific Opinion on Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) in Food  
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2156.htm>.

- [282] DECISIÓN DE LA COMISIÓN de 18 de agosto de 2005 por la que se modifica la Directiva 2002/95/CE del Parlamento Europeo y del Consejo con objeto de establecer los valores máximos de concentración de determinadas sustancias peligrosas en aparatos eléctricos y electrónicos  
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:214:0065:0065:ES:PDF>
- [283] Programa de la ONU para el Medio Ambiente. Evolución del Protocolo de Montreal  
[http://ozone.unep.org/spanish/Ratification\\_status/evolution\\_of\\_mp.shtml](http://ozone.unep.org/spanish/Ratification_status/evolution_of_mp.shtml)
- [284] Toxicological profile for chloroform  
<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp6.pdf>
- [285] Toxicological profile for bromoformo and dibromochloromethane  
<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp130.pdf>
- [286] Toxicological profile for trichloroethylene  
<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp19.pdf>
- [287] Toxicological profile for tetrachloroethylene  
<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp18.pdf>
- [288] DIRECTIVA 2010/75/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 24 de noviembre de 2010 sobre las emisiones industriales  
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:334:0017:0119:es:PDF>.
- [289] Guía técnica para la evaluación y prevención de los riesgos relacionados con los agentes químicos presentes en los lugares de trabajo  
[http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Normativa/GuiasTecnicas/Ficheros/g\\_AQ.pdf](http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Normativa/GuiasTecnicas/Ficheros/g_AQ.pdf)
- [290] DIRECTIVA 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 12 de agosto de 2013 por la que se modifican las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE en cuanto a las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas  
<http://www.boe.es/doue/2013/226/L00001-00017.pdf>
- [291] DIRECTIVA 2011/3/UE DE LA COMISIÓN de 17 de enero de 2011 que modifica la Directiva 2008/128/CE por la que se establecen criterios específicos de pureza en relación con los colorantes utilizados en los productos alimenticios  
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:013:0059:0063:ES:PDF>
- [292] REGLAMENTO (CE) No 1989/2003 DE LA COMISIÓN de 6 de noviembre de 2003 que modifica el Reglamento (CEE) no 2568/91, relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis  
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:295:0057:0077:ES:PDF>
- [293] Christen, V., Hickman, S., Rechenberg, B., Fent, K., *Aquat Toxicol.*, 96 (2010) 167-181.
- [294] Corcoran, J., Winter, M. J., Tyler, C. R., *Crit Rev Toxicol.*, 40 (2010) 287-304.

- [295] Fent, K., Weston, A. A., Caminada, D., *Aquat Toxicol.*, 76 (2006) 122-159.
- [296] Nikolau, A., Meric, S., Fatta, D., *Anal. Bioanal. Chem.*, 387 (2007) 1225-1234.
- [297] Halling-Sørensen, B., Nielsen, S. N., Lanzky, P. F., Ingerslev, F., Holten-Lützhøft, H. C., Jørgensen, S. E., *Chemosphere*, 36 (1998) 357-393.
- [298] Caliman, F. A., Gavrilescu, M., *Clean–Soil, Air, Water*, 37 (2009) 277-303.
- [299] Kanda, R., Griffin, P., James, H. A., Forthergill, J., *J. Environ. Monitor.*, 5 (2003) 823-830.
- [300] Shin, H. S., Oh, J. A., *J. Sep. Sci.*, 35 (2012) 541–547.
- [301] Luo, Y-B., Zheng, H-B., Wang, J-X., Gao, Q., Yu, Q-W., Feng, Y-Q., *Talanta*, 86 (2011) 103-108.
- [302] Vane, J. R, Botting, R. M., *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res.*, 23 (1995) 41-48.
- [303] Vane, J. R, Botting, R. M., *Inflamm Res.*, 47 (1998) S78-87.
- [304] Hernando, M. D., Mezcua, M., Fernandez-Alba, A. R., Barcelo, D., *Talanta*, 69 (2006) 334-342.

# *Capítulo 1*

---

## Capítulo 1 (Artículo Científico)

Del apartado “Capítulo 1” de esta tesis ha sido retirado el artículo referenciado más abajo debido a restricciones relativas a los derechos de autor.

Referencias bibliográficas:

- Manso, J., García Barrera, T., Gómez Ariza, J.L.: “ New home-made assembly for hollow-fibre membrane extraction of persistent organic pollutants from real world samples”. *Journal of Chromatography A*, Nov 4;1218(44):7923-35. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.09.023

Enlace del artículo en la revista:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21962495>



### **Capítulo 1. Desarrollo de una nueva metodología para la determinación de contaminantes orgánicos persistentes en muestras biológicas y de alimentos**

#### **Resumen**

Las técnicas de extracción con membrana de fibra hueca se utilizan ampliamente y cada vez más en el ámbito de la química analítica, pero por lo general se aplican a muestras de agua o con matrices relativamente simples. En este trabajo hemos propuesto un nuevo acoplamiento que permite la extracción de cuarenta contaminantes orgánicos persistentes en muestras de zumo de naranja, tomates y plasma de origen animal. En el proceso de optimización del método de extracción se ha desarrollado un diseño compuesto central para conseguir las condiciones óptimas para todos los analitos y también se ha utilizado una respuesta combinada para alcanzar las condiciones óptimas simultáneas para los cuarenta analitos. Los límites de detección obtenidos son muy bajos, en el rango de los  $\text{ng L}^{-1}$ , incluso en el análisis de muestras reales y las recuperaciones relativas obtenidas están alrededor del 100% para la mayoría de los analitos. El nuevo acoplamiento permite obtener una muy buena precisión que es un defecto habitual de las técnicas de extracción con membranas poliméricas porosas en el análisis de muestras reales complejas.

Los resultados descritos en este capítulo han sido publicados en el trabajo: Manso, J., García-Barrera, T., Gómez-Ariza, J. L., "New home-made assembly for hollow-fibre membrane extraction of persistent organic pollutants from real world samples", *Journal of Chromatography A* 1218 (44), 7923-7935.

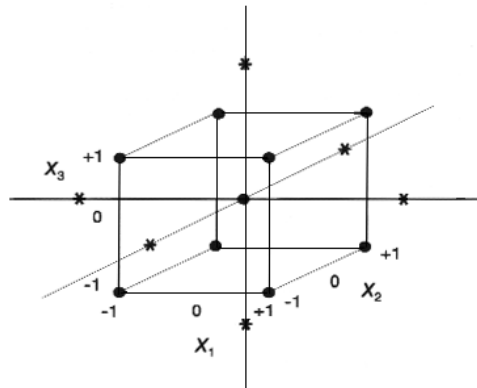
### 1. Introducción

La preocupación por la contaminación del medio ambiente por parte de los contaminantes orgánicos persistentes (Persistent Organic Pollutants, POPs) se ha incrementado enormemente en las últimas décadas. Los contaminantes orgánicos persistentes son un grupo de contaminantes ubicuos y en la actualidad su análisis en muestras ambientales y de alimentos es cada vez mayor debido al marcado aumento en los niveles de estos compuestos en la última década [1, 2]. La acción en el organismo de los plaguicidas organoclorados como disruptores hormonales endocrinos e, incluso, como inductores de cáncer es bien conocida [3]. Se han establecido el carácter persistente y su capacidad para acumularse en los tejidos biológicos de plaguicidas y bifenilos policlorados [3, 4]. Pequeñas cantidades de congéneres de PCBs también se han asociado con una mayor incidencia de aborto [5]. Las propiedades físico-químicas de los difeniléteres polibromados son similares a los PCBs, y por tanto, son tóxicos, persistentes y altamente lipófilos [6]. Se han publicado varios trabajos en relación con el uso de técnicas de extracción con membranas de fibra hueca para la determinación de compuestos orgánicos persistentes. En este sentido, la microextracción con membrana líquida se ha utilizado para la determinación de plaguicidas organoclorados en agua de mar [7] y agua dulce [8-9], para la determinación de PCBs en plasma sanguíneo [5], y de PBDEs en aguas medioambientales [10].

Hoy en día, las técnicas de extracción basadas en el uso de membranas se han convertido en una alternativa prometedora frente a las técnicas analíticas de extracción tradicionales, e incluso, frente a técnicas de extracción más recientes basadas en la miniaturización de las técnicas tradicionales como la microextracción en fase sólida, la microextracción en fase líquida mediante gota suspendida o la microextracción líquido-líquido dispersiva [12]. El principal problema relacionado con las técnicas de microextracción en fase líquida es la reproducibilidad del procedimiento. Así, en el caso de la SDME, la microgota suspendida puede sufrir pérdidas de disolvente o desprenderse fácilmente durante la agitación de la fase donadora, siendo además, poco adecuada para muestras sucias ya que las partículas en la muestra afectan a la extracción haciendo la gota inestable [13]. La introducción de las membranas poliméricas porosas por Pedersen-Bjergaard y Rasmussen solucionaba buena parte de los problemas relacionados con la aplicación a muestras sucias tales como la contaminación entre muestras o la reproducibilidad del procedimiento [14].

El diseño compuesto central (CCD) se introdujo en 1951 por Box y Wilson [15]. Un diseño compuesto consiste en la combinación de un diseño factorial completo o fraccionado y un diseño adicional, normalmente un diseño estrella. Si los centros de ambos

diseños coinciden, se denomina diseño compuesto central (CCD) [16]. Si  $k$  es el número de factores del experimento, el diseño compuesto central se basa en un diseño factorial completo ( $2^k$  experiencias), un diseño estrella ( $2k$  experiencias) y  $C$  replicados extra en el centro del diseño. Por tanto, un CCD requiere  $2^k + 2k + C$  experimentos. Para  $k=3$  factores, un diseño factorial completo comprende 8 experiencias que se localizan en los vértices de un cubo en el que cada eje corresponde a un factor. Se obtienen todas las combinaciones posibles entre  $+1$  y  $-1$ . Los puntos estrella se localizan en los ejes de coordenadas del espacio factorial. Si tenemos tres factores, entonces tendremos los puntos  $(\pm\alpha, 0, 0)$ ,  $(0, \pm\alpha, 0)$  y  $(0, 0, \pm\alpha)$ , donde  $\alpha$  es la distancia desde el centro del diseño hasta un punto estrella (distancia axial). Los puntos de un factor a un nivel son denominados axiales.  $C$  es el número de replicados en el punto central de diseño necesarios para estimar el error experimental. Normalmente, se realizan tres replicados en el punto central del diseño.



**Figura 12.** Diseño compuesto central para tres factores.

Box y Hunter sugirieron en 1957 el empleo de diseños compuestos centrales que fueran “girables” [17]. Estos diseños tienen la propiedad de generar la misma información en todas las direcciones, es decir, al rotar el diseño sobre el origen no se altera la varianza. Esto quiere decir que la varianza de las respuestas predichas, depende solamente de la distancia al centro del diseño. En un diseño compuesto central girable,  $\alpha = 2^{f/4}$ , donde  $f$  es el número de factores.

En el presente trabajo se desarrolla un nuevo acoplamiento para el cual no existe aún un prototipo comercial, para la extracción de 40 contaminantes orgánicos persistentes, incluyendo plaguicidas, PCBs y PBDEs utilizando la técnica de extracción con membrana de fibra hueca. El método es más simple que los que se describen en la bibliografía y los parámetros de calidad del método propuesto, especialmente la reproducibilidad iguala, e incluso mejora los métodos actuales. El método de extracción ha sido optimizado mediante un diseño compuesto central rotatable (RCCD) y la validación se ha realizado sobre muestras reales como zumo de frutas, tomates y de plasma de sangre de cerdo.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Disoluciones, reactivos y muestras

Todos los reactivos y disolventes utilizados en este trabajo tenían la máxima pureza disponible. Isooctano, n-hexano, ciclohexano, n-decano, acetona, acetonitrilo, metanol y tolueno fueron suministrados por Teknokroma (Sant Cugat del Vallés, Barcelona, España). Fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania) el anticoagulante citrato-dextrosa; los plaguicidas: beta-hexaclorociclohexano ( $\beta$ -HCH), lindano ( $\gamma$ -HCH), delta-hexaclorociclohexano ( $\delta$ -HCH), alfa-endosulfan, beta-endosulfan, heptacloro, heptacloro epóxido, aldrín, endrín, dieldrín, clortalonil, alfa-cipermetrín, bifentrín, acrinatrín, fenarimol, posalón, 4, 4'-DDD, 4, 4'-DDT, 4, 4'-DDE y lambda-cihalotrín; y los PCBs: nº 1, nº 5, nº 28, nº 29, nº 47, nº 52, nº 98, nº 138, nº 153, nº 154, nº 171, nº 200. Los PBDEs: nº 28, nº 47, nº 85, nº 99, nº 100, nº 153, nº 154, nº 183 fueron suministrados por Fluka y Accurel, pertenecientes al grupo Sigma-Aldrich. El agua ultrapura (18,2 M $\Omega$  cm) fue obtenida mediante un sistema de purificación Milli-Q Gradient suministrado por Millipore (Watford, Reino Unido).

Las disoluciones primarias se prepararon disolviendo los reactivos comerciales en acetona y se almacenaron en un congelador ( $\approx$ -20°C). Las disoluciones de trabajo necesarias para el calibrado por inyección directa se prepararon diariamente mediante las correspondientes diluciones de las disoluciones primarias en n-hexano. Las disoluciones necesarias para el fortificado de las muestras se prepararon semanalmente por dilución de las correspondientes disoluciones primarias en acetona y fueron almacenadas en un frigorífico y en la oscuridad ( $\approx$ 4°C) hasta su análisis.

Las muestras de tomate y zumo de naranja fueron suministradas por un supermercado local. Las muestras de plasma sanguíneo de cerdo se obtuvieron mediante centrifugación de los tubos de sangre (con anticoagulante) a 1500 g durante 15 minutos.

Tras la centrifugación se observaron tres capas: una fracción superior o sobrenadante de un color amarillo pálido correspondiente al plasma sanguíneo, una segunda fracción de color gris-blanco, correspondiente a la fracción de leucocitos y una tercera fracción en la parte inferior del tubo, de un color rojo oscuro, correspondiente a los eritrocitos o hematíes. Tras la centrifugación, el sobrenadante obtenido se aspiró cuidadosamente para obtener un aislamiento lo más perfecto posible de la fracción del plasma respecto a la fracción de leucocitos. Posteriormente, dicha fracción de plasma se almacenó en un congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

### **2.2. Procedimiento de extracción**

La disposición de la membrana para la microextracción en fase líquida se muestra en la Figura 13. El tipo de fibra hueca utilizada para contener la fase orgánica aceptora (en los poros y el interior de la membrana) fue una membrana porosa de polipropileno Accurel Q3/2 suministrada por Membrana (Wuppertal, Alemania), con un diámetro interno de 600  $\mu\text{m}$ , 200  $\mu\text{m}$  de grosor en la pared de la membrana y 0,2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. La porosidad habitual de este tipo de membranas es del 70%. El sistema de extracción consiste en una pieza de fibra de unos pocos centímetros de longitud (1-3 cm) unida por un extremo a la punta de una micropipeta de 20  $\mu\text{L}$  GELoader (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) [Figura 13]. La membrana porosa se encuentra sellada térmicamente por el extremo libre para evitar pérdidas de la fase orgánica durante la extracción. La muestra acuosa se introduce en un vial de 4 mL que se cubre por un septum de PTFE/silicona de 20 mm de diámetro y 3 mm de espesor, ambos suministrados por Supelco (Bellefonte, Estados Unidos).

La fibra polimérica se corta en pequeños trozos con la longitud adecuada, se sella térmicamente un extremo y se limpia con acetona para eliminar posibles restos del material de la membrana (polipropileno) o posibles interferentes para la determinación de los analitos. Después se dejan secar al aire para su posterior uso.

El procedimiento de extracción comienza con el corte de la punta de micropipeta a la longitud necesaria para asegurar una unión perfecta con la fibra, se atraviesa el septum y se coloca el extremo abierto de la membrana. Después, la fibra se introduce en el disolvente orgánico extractante durante un minuto para abrir los poros de la membrana y permitir la inmovilización de la fase aceptora orgánica en su interior. Posteriormente, se introduce unos instantes en otro vial con agua Milli-Q para eliminar el exceso de disolvente orgánico que queda en la superficie exterior de la membrana. Utilizando una microjeringa de cromatografía de gases Hamilton, de 500  $\mu\text{L}$  (suministrada por Supelco) introducida por

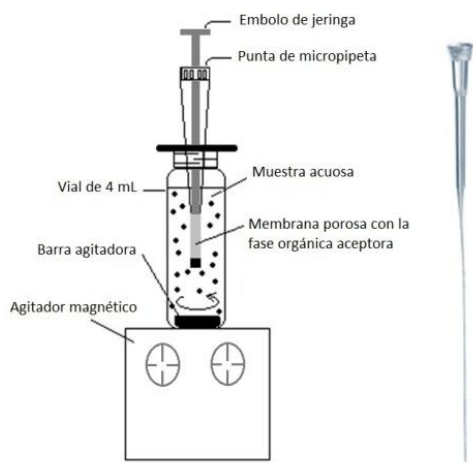
la punta de micropipeta, se elimina el aire por aspiración, y se introduce el disolvente orgánico extractante en el interior de la membrana. Para evitar la pérdida de fase orgánica por la parte superior de la membrana se coloca un émbolo de jeringa para cerrar el montaje [Figura 13]. Finalmente, el dispositivo de extracción se introduce en el vial que contiene 4 mL de muestra de forma que la membrana quede unos pocos milímetros por debajo de la superficie de la muestra. Una vez terminada la extracción, el montaje se saca de la muestra, se corta el extremo sellado y con una microjeringa se extrae la fase aceptora por la parte superior, a través de la punta de micropipeta. Un microlitro del extracto obtenido es utilizado para el análisis cromatográfico.

### 2.3. Análisis cromatográfico

Los extractos obtenidos se analizaron con un cromatógrafo de gases modelo 3800 acoplado a un espectrómetro de masas con trampa de iones Saturn 2000, ambos módulos suministrados por Varian (Sunnyvale, CA, Estados Unidos). El cromatógrafo estaba equipado con una columna capilar de sílice fundida Factor Four (suministrada por Varian) con una fase estacionaria VF-5ms (con un 5% de grupos fenilo y un 95% de dimetilpolisiloxano) y unas dimensiones de 30 metros, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor en la capa de fase estacionaria. Se inyectó del extracto en el sistema de inyección con/sin división del cromatógrafo, configurado en modo sin división durante 45 segundos. La temperatura del inyector se mantuvo constante a 250°C. Se utilizó como gas portador helio a un flujo de 1,3 mL  $\text{min}^{-1}$ . La temperatura de la línea de transferencia entre el cromatógrafo y el detector de masas se mantuvo a 280°C. El programa de temperaturas del método cromatográfico consta de las siguientes etapas: un mantenimiento inicial de 1 minuto a 75°C; un aumento de temperatura inicial hasta 150°C mediante una rampa de 30°C  $\text{min}^{-1}$ ; una segunda subida mediante una rampa de 5°C  $\text{min}^{-1}$  hasta 180°C y un mantenimiento a esa temperatura durante 15 minutos; un tercer aumento de temperatura hasta 190°C a 5°C  $\text{min}^{-1}$  y un mantenimiento durante 5 minutos; una cuarta rampa a 5°C  $\text{min}^{-1}$  hasta 200°C y un mantenimiento durante 3 minutos; una quinta subida de la temperatura hasta 280°C con un mantenimiento 2,5 minutos y, finalmente, un aumento a 50°C  $\text{min}^{-1}$  hasta 290°C con una constancia a esa temperatura durante 4,8 minutos. El tiempo cromatográfico total fue de 60 minutos. Las condiciones de detección de masas bajo impacto electrónico (EI) se resumen en la Tabla 5.

Los extractos obtenidos se analizaron simultáneamente con un cromatógrafo de gases modelo 6890N acoplado a un detector de captura de electrones (ECD), de Hewlett-Packard (HP) (Wilmington, DE, Estados Unidos). Se utilizó una columna cromatográfica CP-SIL 8

suministrada por Chrompack (Middelburg, Países Bajos) con 30 metros de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25  $\mu\text{m}$  de fase estacionaria. El programa de temperatura del horno del cromatógrafo, la temperatura del inyector y el flujo de helio en columna que se utilizaron fueron los que se han descrito previamente. El gas portador/estabilizador (make-up) utilizado fue nitrógeno a un flujo de 40 mL  $\text{min}^{-1}$  y la temperatura del detector se mantuvo a 300°C.



**Figura 13.** Esquema de la disposición de la membrana para la extracción y una punta de micropipeta GEloader de 20  $\mu\text{L}$ .

### 2.4. Diseño experimental y análisis estadístico de datos

El diseño experimental utilizado en este trabajo consiste en la optimización de las variables experimentales que afectan a la microextracción en fase líquida con membranas porosas mediante un diseño compuesto central de segundo orden completo (CCD). Los cálculos necesarios se realizaron con el programa STATISTICA (STAT-Soft, Tulsa, OK, Estados Unidos) y algunos programas en QuickBasic. Este tratamiento estadístico se ha utilizado con excelentes resultados en otros trabajos publicados previamente [18, 19].

### 3. *Discusión y resultados*

#### 3.1. *Desarrollo de un nuevo acoplamiento para la microextracción en fase líquida*

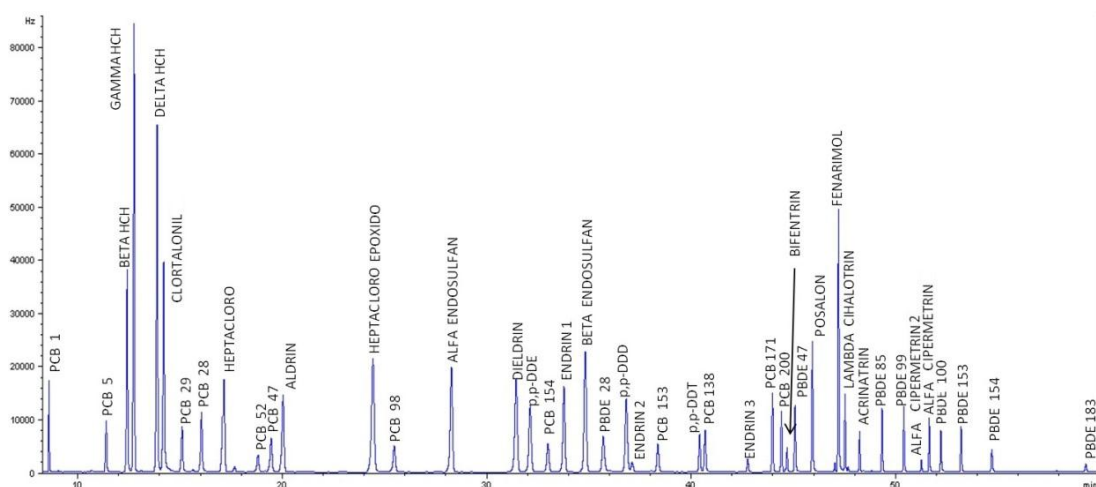
A pesar del gran número de estudios y aplicaciones de las membranas porosas para la extracción de analitos orgánicos existe una carencia de prototipos comerciales, lo que implica, como requisito, una buena cualificación por parte del analista para que la reproducibilidad del procedimiento de extracción no se vea afectada negativamente. Por tanto, la sencillez y aplicabilidad del procedimiento deben ser características fundamentales del mismo. El acoplamiento diseñado en nuestro grupo [Figura 13] utiliza una membrana encajada en una punta de micropipeta GELoader de 20  $\mu\text{L}$  que se puede cortar con la longitud necesaria para unir perfectamente el diámetro interior de la membrana (600  $\mu\text{m}$ ) al diámetro exterior de la punta de micropipeta. La sencillez y reproducibilidad de este acoplamiento representan una mejora importante con respecto a otros sistemas basados en el uso de agujas de jeringa. De acuerdo con nuestra experiencia, la microextracción con membranas porosas presenta como inconveniente principal que la membrana se separa con frecuencia de la aguja durante la manipulación, por ejemplo, durante la agitación de la disolución de la muestra en el vial o durante la inserción/extracción de la fibra en el vial. Además, el uso de microjeringas de gases como soporte de la membrana para realizar la extracción implica un aumento en el coste del procedimiento cuando se quieren realizar varias extracciones simultáneamente.

Por otra parte, no se observan pérdidas de analitos durante la extracción cuando se realiza la extracción sin sellar el vial de muestra. Por lo tanto, el procedimiento se puede simplificar sustancialmente con el uso de un septum para cubrir el vial y apoyar la punta de micropipeta conectada a la fibra. Por último, la introducción del disolvente de extracción en la membrana se lleva a cabo por la inmersión del conjunto de punta de micropipeta-membrana en un vial que contiene el disolvente extractante durante un minuto y con la aspiración del aire del interior de la fibra con una jeringa por la parte superior de la punta de micropipeta. Este procedimiento evita la presencia de burbujas de aire en la membrana y el llenado incompleto de los poros y el interior de la fibra con el disolvente de extracción, lo cual es un inconveniente frecuente cuando la fase aceptora se introduce en la membrana directamente usando una jeringa.

#### 3.2. *Optimización de la separación cromatográfica y detección de masas*

La separación cromatográfica de los analitos de interés no fue una tarea fácil debido a su número y a las diferentes propiedades físico-químicas de los mismos que aumenta las

probabilidades de coelución. Aprovechando las grandes ventajas de los equipos cromatográficos disponibles se consiguió una excelente separación de los cuarenta compuestos con las condiciones descritas en la sección 3.2.3. La Figura 14 muestra un cromatograma obtenido con inyección directa, en el que puede observarse la separación de todos los analitos. En este trabajo, se combina la elevada sensibilidad del detector de captura de electrones con la selectividad del espectrómetro de masas para obtener bajos límites de detección y una identificación inequívoca de los analitos en las muestras. Como se mencionó en la sección 3.2.3., las condiciones de detección de MS-MS bajo impacto electrónico (EI) se resumen en la Tabla 5.



**Figura 14.** Cromatograma obtenido por inyección directa de los cuarenta analitos en concentración  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ .

### 3.3. Optimización univariante de la microextracción en fase líquida

Las variables más importantes que afectan a la microextracción en fase líquida con membranas poliméricas porosas (HF-LPME) son las siguientes: tipo de disolvente de extracción (fase aceptora), la longitud de la fibra, el tiempo de inmersión para la inmovilización del disolvente orgánico en los poros y el tiempo de extracción, el porcentaje de disolvente orgánico modificador en la muestra, la velocidad de agitación, la temperatura y la fuerza iónica (porcentaje de sal). Para la selección preliminar de las variables críticas para el proceso de extracción se llevó a cabo una optimización univariante

## *Capítulo 1*

de algunos de ellos y se fijaron de la siguiente manera: temperatura ambiente (25°C), la longitud de la membrana en 1,5 cm, el tiempo de inmersión en 1 minuto, no se añadió sal para el ajuste de la fuerza iónica (0% NaCl), el tiempo de extracción en 5 minutos, no se añadió ningún disolvente orgánico modificador en la muestra (0%) y el volumen de la muestra utilizado fue de 4 mL.

**Tabla 5.** Parámetros instrumentales del espectrómetro de masas.

Analitos	Ion precursor (m/z)	Iones producto (m/z)	Parámetros CDI	
			Nivel de excitación (m/z)	Amplitud (V)
PCB 1	188	153	83	1,5 <sup>a</sup>
PCB 5	222	187	98	1,6 <sup>a</sup>
Beta HCH	181	148, 147, 145	80	71 <sup>b</sup>
Gamma HCH	183	148, 147, 145	80	71 <sup>b</sup>
Delta HCH	181	148, 147, 145	80	71 <sup>b</sup>
Clortalonil	266	133	117	95 <sup>b</sup>
PCB 29	258	188, 186	114	1,8 <sup>a</sup>
PCB 28	258	188, 186	114	1,8 <sup>a</sup>
Heptacloro	272	237	120	60 <sup>b</sup>
PCB 52	292	255, 257	129	1,5 <sup>a</sup>
PCB 47	292	255, 257	129	1,5 <sup>a</sup>
Aldrín	263	228	116	100 <sup>b</sup>
Heptacloro epóxido	353	335, 317, 300	156	55 <sup>b</sup>
PCB 98	326	254, 256	144	1,7 <sup>a</sup>
Alfa endosulfan	241	170, 172, 204, 206,	106	84 <sup>b</sup>
Dieldrín	263	228	116	70 <sup>b</sup>
p,p'-DDE	246	211, 176	109	100 <sup>b</sup>
PCB 154	360	325	159	2,4 <sup>a</sup>
Beta endosulfan	241/195	170, 172, 204, 206,	106	64 <sup>b</sup>
PBDE 28	404	246, 248	178	3,3 <sup>a</sup>
p,p'-DDD	235	165	104	95 <sup>b</sup>
PCB 153	360	325	159	2,4 <sup>a</sup>
p,p'-DDT	235	200, 165	104	75 <sup>b</sup>
PCB 138	360	290, 323, 325	159	1,9 <sup>a</sup>
Endrín	263	228, 81	116	60 <sup>b</sup>
PCB 171	396	357, 359	175	2,5 <sup>a</sup>
PCB 200	430	393, 395	190	2,7 <sup>a</sup>
Bifentrín	181	165	80	70 <sup>b</sup>
PBDE 47	484	324, 326	214	3,5 <sup>a</sup>
Posalón	182	75, 111	80	65 <sup>b</sup>
Fenarimol	139	107	61	82 <sup>b</sup>
Lambda Cihalotrín	181	141, 161	80	52 <sup>b</sup>

Analitos	Ion precursor (m/z)	Iones producto (m/z)	Parámetros CDI	
			Nivel de excitación (m/z)	Amplitud (V)
Acrinatrín	181	152	80	90 <sup>b</sup>
PBDE 85	566	404, 406	249	3,8 <sup>a</sup>
PBDE 99	566	404, 406	249	3,8 <sup>a</sup>
Alfa Cipermetrín	163	127	72	62
PBDE 100	566	404,406	249	3,8 <sup>a</sup>
PBDE 153	484	482, 484	214	3,5 <sup>a</sup>
PBDE 154	484	482, 484	214	3,5 <sup>a</sup>
PBDE 183	564	404, 406	249	5,4 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> MSMS resonante

<sup>b</sup> MSMS no-resonante

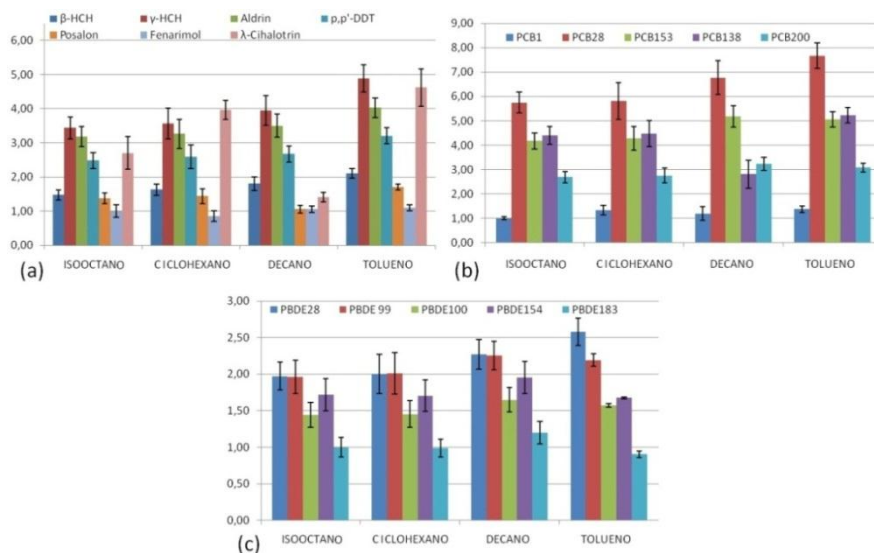
### 3.3.1. Optimización del tipo de disolvente

Uno de los parámetros más importantes que afectan a la HF-LPME es el tipo de disolvente orgánico extractante, es decir, la fase aceptora utilizada. Para alcanzar una alta efectividad en la extracción de los analitos de interés debe cumplir una serie de requisitos. En primer lugar, la fase aceptora debe ser selectiva en cuanto a la naturaleza de los analitos, es decir, estos deben tener una alta tendencia a disolverse y abandonar la muestra. En segundo lugar, el disolvente orgánico debe permanecer inmobilizado en los poros de la membrana y debe ser inmiscible en agua para que no se produzcan pérdidas de fase aceptora durante todo el proceso de extracción. Finalmente, el disolvente orgánico utilizado como fase aceptora debe ser adecuado para la técnica utilizada para el análisis. Teniendo en cuenta estas condiciones, se ensayaron cuatro tipos diferentes de disolventes para la extracción de los contaminantes orgánicos persistentes: iso octano, ciclohexano, n-decano y tolueno. Los resultados obtenidos con cada uno de ellos se muestran en la Figura 15. Como puede observarse, el disolvente más adecuado para la extracción de la mayoría de los analitos es el tolueno, por lo que este disolvente se seleccionó como fase aceptora en el procedimiento de extracción. Se consideró suficiente un tiempo de inmersión de 1 minuto para abrir los poros de la membrana e inmobilizar la fase aceptora en su interior debido a que tiempos más largos no aumentan el rendimiento de la extracción.

### 3.3.2. Optimización de la velocidad de agitación

El proceso de extracción con membrana en la modalidad de dos fases se basa en la difusión simple del analito desde la muestra hasta la fase aceptora orgánica en el interior de la fibra. Por esta razón, la agitación de la muestra puede contribuir a reducir el tiempo

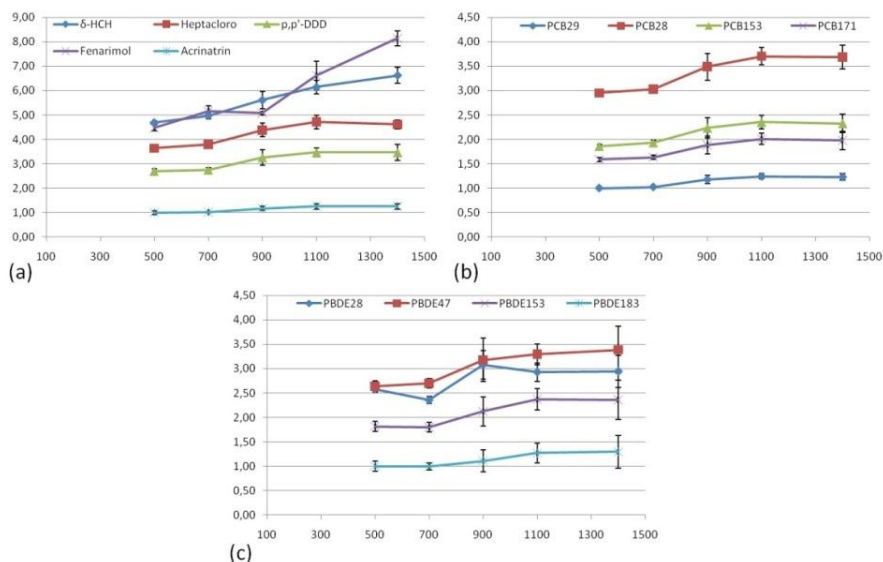
que necesitan los analitos para alcanzar la membrana y también favorecer el equilibrio de reparto de los analitos entre la fase aceptora y la muestra. Basándonos en ello, se ensayaron velocidades de agitación en el rango de 500 rpm a 1400 rpm, y los resultados se muestran en la Figura 16. Se puede observar que el aumento de la velocidad de agitación de la muestra mejora la efectividad de la extracción de todos los analitos, aunque para altas velocidades de agitación aparecen burbujas de aire en el interior de la membrana y pérdidas de la fase aceptora que son perjudiciales para la reproducibilidad de análisis. Por lo tanto, se fijó un valor de compromiso en 1100 rpm para el procedimiento de extracción.



**Figura 15.** Efecto del tipo de disolvente en el área relativa de (a) plaguicidas, (b) PCBs y (c) PBDEs. El área relativa se obtiene como: área del pico del analito/área de pico más pequeña obtenida.

### 3.3.3. Optimización de la cantidad de disolvente orgánico modificador

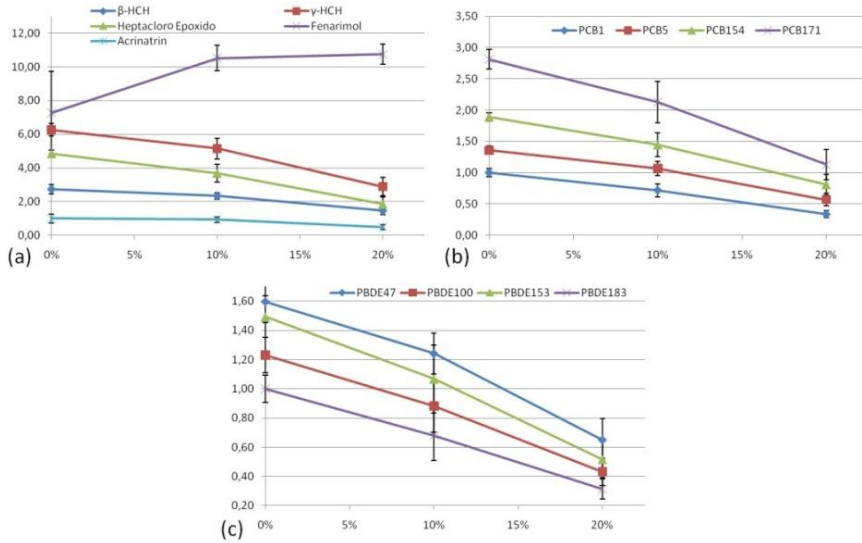
La adición a la muestra de un disolvente orgánico modificador que actúe como un canal de transferencia de los analitos entre la fase donadora y la aceptora orgánica puede incrementar la eficiencia de la extracción [20, 21]. Para comprobar este efecto, se realizaron ensayos con acetonitrilo y metanol en diferentes porcentajes (0%, 10%, 20% y 30%). La adición de acetonitrilo provoca la disminución de las áreas de los picos cromatográficos y el metanol no afecta significativamente a la eficiencia de la extracción de los analitos [Figuras 17 y 18]. Por lo tanto, no se utilizaron disolventes adicionales al extractante en el procedimiento de extracción.



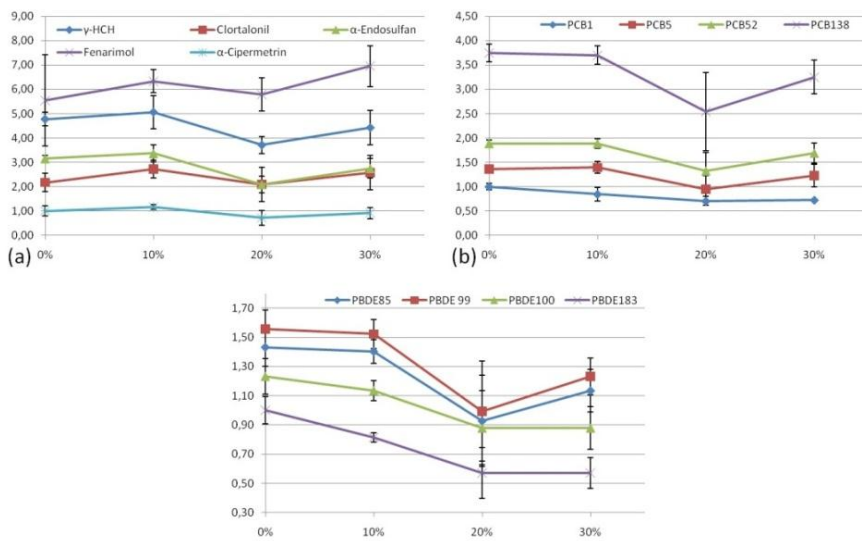
**Figura 16.** Efecto de la velocidad de agitación de la muestra en el área relativa de (a) plaguicidas, (b) PCBs y (c) PBDEs. El área relativa se obtiene como: área del pico del analito/área de pico más pequeña obtenida.

### 3.3.4. Optimización del ajuste de la fuerza iónica

Finalmente, la adición de sal a la muestra puede tener diferentes efectos. Por un lado, la adición de sal puede reducir la cantidad de agua disponible para disolver las moléculas de analito debido a la formación de esferas de hidratación alrededor de los iones de la sal [22] mejorando la disolución de los analitos en la fase aceptora. Por otro lado, la adición de sal aumenta la fuerza iónica de la muestra y cambia las propiedades físicas de la película de difusión de Nernst, alterando los coeficientes de difusión de los analitos a la fase orgánica afectando la eficiencia de la extracción [5, 21, 23, 24]. Teniendo en cuenta estas consideraciones, la presencia de sal (NaCl) en la muestra se estudió de 0 a 30% (w/v). Los ensayos mostraron que este factor no contribuye significativamente a la efectividad de la extracción de los analitos y, por tanto, no se consideró necesaria la adición de NaCl en el procedimiento de extracción.



**Figura 17.** Efecto de la adición de acetonitrilo como disolvente modificador a la muestra en el área relativa de (a) plaguicidas, (b) PCBs y (c) PBDEs. El área relativa se obtiene como: área del pico del analito/área de pico más pequeña obtenida.



**Figura 18.** Efecto de la adición de metanol como disolvente modificador a la muestra en el área relativa de (a) plaguicidas, (b) PCBs y (c) PBDEs. El área relativa se obtiene como: área del pico del analito/área de pico más pequeña obtenida.

### 3.4. Optimización multivariante de la microextracción en fase líquida

Se construyó un diseño compuesto central girable de segundo orden (Rotable Central Composite Design, RCCD) Para una mejor comprensión de la influencia de las variables estudiadas en la extracción de los contaminantes orgánicos persistentes por HF-LPME. Para ello, se tuvieron en cuenta tres variables: el tiempo de extracción ( $X_1$ ), la temperatura de extracción ( $X_2$ ) y la longitud de la fibra ( $X_3$ ). El CCD introducido por Box y Wilson en 1951 [15]; consiste en un diseño factorial completo  $2^k$  (siendo  $k$  el número de variables,  $k = 3$ ) aumentado con  $2k$  vértices (puntos axiales) situado en los ejes de coordenadas del espacio factorial y  $C$  puntos (número de replicados) en el centro del diseño,  $(0,0,\dots, 0)$ . Para los tres factores, los puntos resultantes son  $(\pm \alpha, 0, 0)$ ,  $(0, \pm \alpha, 0)$  y  $(0, 0, \pm \alpha)$ , donde  $\alpha$  es la distancia desde el centro del diseño a un punto axial. Esto implica la realización de  $N = 2k + C$  experimentos. En el presente trabajo, se ha aplicado un CCD girable (introducido en 1957 por Box y Hunter [17]) en el que la varianza de los valores de respuesta predichos sólo depende de la distancia desde el centro del diseño y  $\alpha = 2^{k/4}$  (siendo  $k$  el número de variables,  $k = 3$ ).

En este estudio, cada variable tiene cinco niveles codificados  $(-\alpha, -1, 0, 1, \alpha)$ . Los puntos extremos del diseño  $-\alpha$  y  $\alpha$  se asocian con el valor mínimo y máximo del factor en estudio en el rango de trabajo. La Tabla 6 muestra la matriz del diseño experimental del RCCD ( $\alpha = 1,68$ ) con los niveles reales y codificados. El punto central se llevó a cabo por triplicado ( $C = 3$ ) para poder realizar la estimación del error experimental y la aplicación del RCCD se realizó mediante 17 experimentos. Los experimentos se realizaron al azar para evitar errores sistemáticos. La Tabla 7 recoge las respuestas (áreas de los picos cromatográficos de los analitos) obtenidas en los diferentes experimentos (RCCD) llevados a cabo mediante HF-LPME para su optimización.

Los resultados para el diseño experimental se sometieron a regresión múltiple para obtener los coeficientes del polinomio de segundo orden [Ecuación 21], donde "y" es la respuesta experimental,  $\beta$  los coeficientes de la ecuación y  $\chi_i$  y  $\chi_j$  los niveles codificados de las variables  $i$  y  $j$ , respectivamente. Se realizó Un ensayo de significación para los coeficientes de regresión utilizando test de la t de Student, una vez conocida la desviación estándar de los coeficientes de regresión  $b_k$ ,  $s(b_k)$ . En esta prueba, la significancia del efecto se demuestra cuando se encuentra que su valor absoluto [Ecuación 22] es mayor que el valor crítico tabulado  $t_{crit}(u, P)$  para los grados de libertad  $u$  correspondientes al modelo de regresión probado ( $u =$  número de experimentos - número de coeficientes a estimar) con un nivel de confianza de  $P$  del 95%.

$$y = \beta_0 + \sum \beta_i \cdot \chi_i + \sum \beta_{ii} \cdot \chi_i^2 + \sum \beta_{ij} \cdot \chi_i \cdot \chi_j \quad (21)$$

$$t_k = \frac{|b_k|}{s(b_k)} \quad (22)$$

Los modelos reducidos que representan la relación entre las variables y las respuestas obtenidas se recogen en la Tabla 8. Como podemos ver, todas las variables tienen efectos significativos en la respuesta de todos los analitos y el efecto es positivo. Los términos cuadráticos de las variables son significativos en la respuesta para algunos analitos, en especial para algunos plaguicidas, que indican un alto efecto en la respuesta. En la mayoría de los casos, la interacción entre el tiempo de extracción y la temperatura tiene un efecto positivo en el área de los picos de los analitos. También está presente en muchos casos como un efecto positivo la interacción entre la temperatura y la longitud de la membrana. En algunos casos, la interacción del tiempo de extracción con la longitud de la membrana tiene un efecto significativamente positivo en las áreas de los picos de los analitos.

**Tabla 6.** Matriz del diseño experimental del RCCD

Experimento	Tiempo ( $X_1$ )		Temperatura ( $X_2$ )		Longitud ( $X_3$ )	
	Valor	Valor real	Valor	Valor real	Valor	Valor real
	codificado	(min.)	codificado	(°C)	codificado	(mm)
1	-1	13	-1	34	-1	14
2	1	37	-1	34	-1	14
3	-1	13	1	46	-1	14
4	1	37	1	46	-1	14
5	-1	13	-1	34	1	26
6	1	37	-1	34	1	26
7	-1	13	1	46	1	26
8	1	37	1	46	1	26
9	0	25	0	40	0	20
10	0	25	0	40	0	20
11	-1.68	5	0	40	0	20
12	1.68	45	0	40	0	20
13	0	25	-1.68	30	0	20
14	0	25	1.68	50	0	20
15	0	25	0	40	-1.68	10
16	0	25	0	40	1.68	30
17	0	25	0	40	0	20

Table 7. Respuestas (áreas de pico) para los plaguicidas (a), PCBs (b) and PBDEs (c) obtenidas por HF-LPME en los experimentos del RCCD.

Experimento → (b)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
B-HCH	37121	92107	46879	107332	50524	52939	90219	273544	71973	79142	37156	127614	47558	140663	80838	153331	70251
γ-HCH	35541	109223	57239	178029	77249	105949	162521	479588	120563	121656	52517	268493	57074	281784	107860	238136	122659
δ-HCH	67591	124407	78012	206971	52934	114615	158651	446420	144427	149151	45351	207147	61188	308022	118942	235717	147077
Clortalonil	51313	102057	69866	159249	44630	86208	153480	383450	115918	113328	48201	148048	56239	239600	97217	197760	115879
Heptacloro	23689	39180	15486	42349	13193	36132	36422	122835	21951	20189	11099	53265	13365	51863	18213	64773	20898
Aldrin	28434	44729	13781	38884	16651	33637	33880	110951	20033	18739	14253	53108	13018	52584	19517	55746	19038
Heptacloro Epóxido	26227	54558	34257	63393	33632	38958	69453	189899	35270	34585	23308	87408	17551	100433	35834	93163	39681
α-Endosulfan	19711	33193	20883	69644	19531	37930	45403	162109	25581	25607	19305	74103	12335	81505	28103	70741	25287
Dieldrin	22049	38262	19111	61589	20873	42004	46010	156840	21322	22490	20642	66042	11674	74408	27241	92937	23157
p,p'-DDE	15883	22864	11302	38746	15062	40903	39859	150908	18576	13698	19614	75658	8935	72170	15123	76554	15916
β-Endosulfan	7550	35238	29183	47803	24592	39981	42930	196262	31113	37181	15919	85430	12852	82737	22142	89755	35783
p,p'-DDD	14847	30066	11338	42618	16252	40729	36746	158997	14498	12649	15882	72193	7806	75756	14026	84209	14186
p,p'-DDT	14617	16262	6986	30800	9053	22636	30599	132188	10072	9567	8923	54930	3171	58480	6875	56011	9803
Endrin	10682	45609	19819	50748	23683	46054	39320	185412	21675	20610	18387	93232	10630	106809	25579	96801	23281
Peraldin	2527	8952	2640	10928	3948	7871	7168	31965	4864	5352	3815	13942	1550	13892	2842	17376	4642
Fenitrofenol	6033	31227	9195	59426	23303	22637	41879	177913	10710	15349	7605	82109	4402	106572	10660	89623	12075
λ-Chlortalonil	39607	70455	47460	102115	44038	104052	123742	365878	96431	98747	23963	122714	61694	128435	59311	126196	98889
Acrinatrin	4377	15095	6711	27816	9704	19938	35185	93155	5390	4389	8953	54358	2406	67536	6637	52455	5452
α-Cipermetrin	3664	8092	3977	14350	6002	11779	23328	95285	3415	4412	5731	21639	1450	29650	4197	37534	4745

Experimento → (b)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
PCB 1	8967	22519	13288	29570	12816	24534	17923	68634	21503	23919	4273	62413	9116	23084	19022	26205	23675
PCB 5	2338	13061	1443	25478	1797	16863	16735	51102	8355	10452	6484	36161	5528	29051	7672	30805	9086
PCB 29	1840	16965	5689	24185	7861	20175	7234	55717	9174	9700	7767	30215	6415	21869	6927	24858	7931
PCB 28	19506	23606	13254	48425	18073	32526	24709	139855	20880	20954	17735	75941	140259	52510	15946	54450	18831
PCB 52	2095	8597	5045	13778	6953	16344	10860	58461	7145	6990	6872	20235	4924	17065	5816	22666	6651
PCB 47	4367	11217	5729	15848	8331	15150	12220	47725	8868	8420	8059	26062	5971	18281	6946	21805	8010
PCB 98	3534	9927	5593	19665	7882	13176	6486	42266	7942	7309	7453	20654	4830	17933	6334	16134	7328
PCB 154	4337	10505	6234	16951	8595	13810	11582	41930	7843	7046	8437	20126	5145	19236	6637	23919	8332
PCB 153	8979	14882	8274	24441	11857	17471	16642	78997	9955	8542	11525	26789	6262	26243	8921	34695	11055
PCB 138	7697	15065	9587	28517	13529	21700	19755	75843	10981	9578	13129	34299	6784	31321	10086	22732	12892
PCB 171	5629	11008	8326	24279	12273	17612	18283	66441	9161	7528	11847	28646	5648	29158	9323	35089	12129
PCB 200	4955	8896	6319	23472	9148	18264	16062	45513	9640	8451	5829	20087	4077	21430	6960	26555	9282

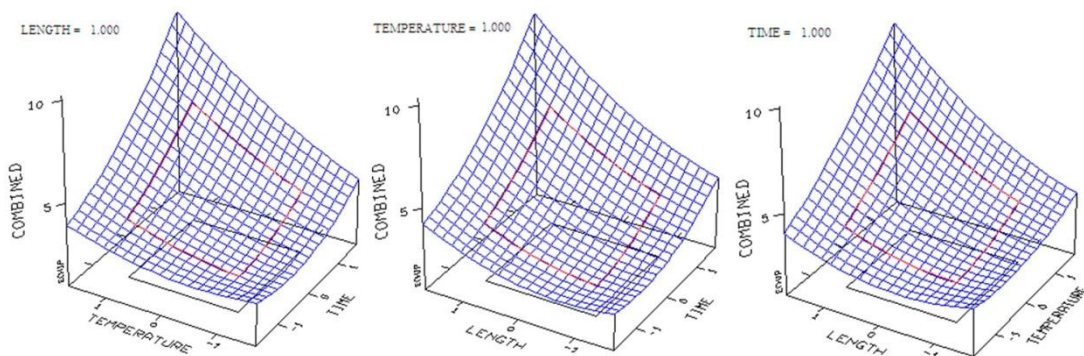
Experimento → (c)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
PBDE 28	8385	27810	14094	37115	15519	27889	31875	99963	24059	22096	15028	51834	8299	42362	12504	42663	24505
PBDE 47	6320	20893	9794	39212	14563	31510	24509	79962	25229	22578	13941	39295	5849	35391	11432	33609	24697
PBDE 85	7232	13821	7510	29124	15167	22710	18722	59378	16449	14440	11570	29289	8551	28330	9547	27744	17996
PBDE 99	7541	13597	6467	24907	14213	23044	22618	56702	18026	20967	11642	30497	8131	25737	9978	31720	18086
PBDE 100	4027	8876	5170	10262	8644	15366	9374	40594	7681	6691	8105	19456	6822	16057	7007	17412	7633
PBDE 153	5289	10516	6052	13711	9612	16044	12573	45512	8870	7474	8983	22101	6956	14896	7881	21440	9992
PBDE 154	4031	8703	5624	9235	8747	14141	8944	31942	8060	6680	6135	17833	6602	15568	7070	18183	8405
PBDE 183	1718	6030	3701	5777	4704	7050	7051	27128	4472	5770	2323	11039	3556	13799	1909	13389	4192

Debido a que no se observaron diferencias importantes en la influencia del efecto de las variables en la respuesta de los diferentes analitos, se llevó a cabo la optimización de la respuesta. Por lo tanto, en este caso, el objetivo de la optimización es la maximización simultánea de las áreas de los picos de todos los contaminantes orgánicos persistentes. La respuesta combinada se ha aplicado con excelentes resultados en otros trabajos [25] y se puede describir brevemente como una variable de respuesta que se calcula mediante una suma ponderada de varias respuestas de acuerdo con la Ecuación 23.

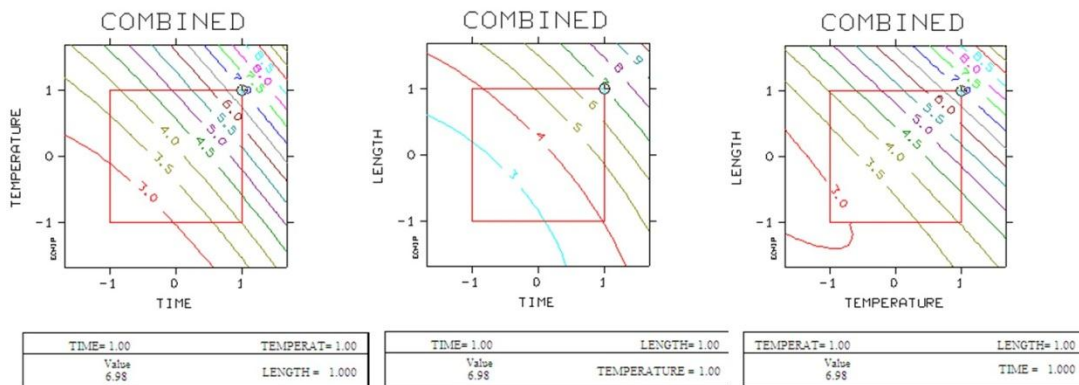
$$COMB = \sum_i \left\{ k w_i \cdot \left| \frac{Y_i - G_i}{R_i} \right| \right\} \quad (23)$$

donde  $w_i$  es un peso elegido, generalmente la unidad,  $Y_i$  es cada respuesta a ser optimizada y  $R_i$  es el rango de trabajo de  $Y_i$ . Cuando las respuestas en la respuesta combinada deben ser maximizadas, entonces  $k = 1$  y  $G_i = \text{mínimo} \{Y_i - 1/2 R_i\}$ . El máximo de la superficie COMB ( $X_1, X_2, X_3$ ) es el óptimo simultáneo para la variable estudiada.

La forma de la superficie 3D de la respuesta combinada para las variables tiempo de extracción y longitud de la membrana se representa gráficamente en la Figura. 18, y el correspondiente gráfico de contorno que muestra el punto óptimo se muestra en la figura. 19. Como puede verse, el valor óptimo se alcanza en el punto con coordenadas para las variables igual a uno, que corresponde a 37 min de tiempo de extracción, 46 °C y 26 mm de longitud de la membrana.



**Figura 19.** Superficies COMB en 3D que representan la respuesta combinada frente a las variables optimizadas.



**Figura 20.** Gráficos de contorno que muestran el punto óptimo para las variables optimizadas.

### 3.5. Validación del método

Una vez optimizada la metodología analítica, se calcularon los parámetros de calidad correspondientes Para probar la aplicabilidad para la extracción de compuestos orgánicos persistentes en muestras reales de zumo de naranja, tomate triturado y plasma de sangre de cerdo. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 9. Se obtuvieron curvas de calibración lineales para todos los analitos con muy buenos coeficientes de correlación ( $R^2 > 0,997$ ). Los límites de detección y cuantificación (LOD y LOQ, respectivamente) se calcularon con los datos generados en los estudios de linealidad. Después de la reordenación de la función de calibración, el límite de detección y el límite de cuantificación se calcularon como la concentración de analito que corresponde a una señal igual a " $a + 3 S_{y/x}$ " y " $a + 10 S_{y/x}$ ", respectivamente, donde " $a$ " es la ordenada en el origen, y " $S_{y/x}$ " indica los errores aleatorios en los valores de la pendiente. Los límites de detección se encuentran en el rango desde 15 hasta 106 ng L<sup>-1</sup> [Tabla 9], que representan valores muy bajos en comparación con otros resultados publicados en la bibliografía.

Para evaluar la efectividad del proceso de extracción en muestras reales se calcularon los factores de enriquecimiento para cada analito según la Ecuación 19, donde  $V_d = 4 \text{ mL de muestra}$  (volumen de la fase acuosa donadora) y  $V_o = 20 \mu\text{L de tolueno}$  (volumen de la fase orgánica aceptora). Se calcularon los factores de enriquecimiento para la extracción de 500 ng L<sup>-1</sup> para todos los analitos en las diferentes muestras y los datos se presentan en la Tabla 9. Podemos observar que los factores de enriquecimiento están alrededor de unas 100

veces. Este hecho nos llevó a concluir que la técnica es muy eficiente para la extracción de los contaminantes orgánicos persistentes en muestras acuosas con matrices complejas.

La reproducibilidad del método diseñado se estudió mediante la medida de la desviación estándar relativa (%RSD) para cinco inyecciones secuenciales de los analitos a dos concentraciones diferentes ( $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$  y  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ) en agua y los resultados están en el rango del 8 al 15%.

### **3.6. Aplicación a muestras reales**

El procedimiento propuesto se ha aplicado a muestras reales, es decir, zumo de naranja comercial, tomate triturado y plasma de sangre de cerdo. Se llevaron a cabo estudios de recuperación en muestras enriquecidas a dos concentraciones diferentes  $0,5$  y  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  para las muestras de zumo de naranja y  $0,25 \mu\text{g L}^{-1}$  y  $0,75 \mu\text{g L}^{-1}$  para las de tomate triturado y plasma de sangre de cerdo. Las recuperaciones relativas para un método de extracción con membranas poliméricas porosas se determinan como la relación de las concentraciones encontradas realizando la extracción en agua ultrapura enriquecida y las encontradas en las muestras fortificadas a la misma concentración [Tabla 10]. Las desviaciones estándar para los estudios de recuperación ( $n = 3$ ) se encuentran en el rango del 4 al 17%, demostrando la buena reproducibilidad del método propuesto.

## **4. Conclusiones**

En este trabajo se ha diseñado y optimizado un nuevo método de extracción mediante membranas poliméricas porosas para la determinación de cuarenta compuestos orgánicos persistentes en muestras biológicas y de alimentos. Los analitos determinados en este estudio cubren un amplio número de plaguicidas, PCBs y PBDEs, muchos de ellos incluidos en el Convenio de Estocolmo y, por tanto, de amplio interés para la sociedad. La optimización del método de extracción se ha realizado con el objetivo de conseguir las mejores condiciones para el análisis simultáneo de todos ellos. Se calcularon las condiciones de extracción óptimas para todos los analitos, mediante la aplicación de enfoques quimiométricos basados en el uso de métodos de diseño experimental. Los métodos estadísticos descritos en este trabajo proporcionan herramientas útiles para la optimización simultánea de todas las respuestas de los compuestos en estudio. El método propuesto presenta límites de detección en el rango de  $\text{ng L}^{-1}$ , recuperaciones de alrededor del 100% para la mayoría de los analitos y altos factores de enriquecimiento que superan

las características analíticas de otros métodos descritos en la bibliografía. La desviación estándar relativa como parámetro de calidad del método se encuentra en el rango del 4 al 17% para todos los analitos, incluso en muestras complejas biológicas y de alimentos. El método propuesto es muy simple, barato y preciso, por lo que se puede utilizar para el análisis de rutina en la determinación de compuestos orgánicos persistentes en muestras de alimentos y muestras biológicas.

Table 8. Modelos reducidos representando la relación entre las variables y las respuestas de (a) Plaguicidas, (b) PCBs and (c) PBDEs.

(a)	Modelos finales
β-HCH	$Y = 91717,04 + 33210,4 X_1 + 32371,11 X_2 + 22394,99 X_3 + 23297,08 X_4 X_5 + 29414,42 X_6 X_7$
γ-HCH	$Y = 151768,5 + 66477,64 X_1 + 67639,27 X_2 + 48966,75 X_3 + 41432,46 X_4 X_5 + 45552,88 X_6 X_7$
δ-HCH	$Y = 156507,8 + 58707,42 X_1 + 68831,85 X_2 + 36484,99 X_3 + 36530,21 X_4 X_5 + 43818,21 X_6 X_7$
Chlortalonil	$Y = 128379 + 42464,52 X_1 + 57889,06 X_2 + 33287,07 X_3 + 28378,96 X_4 X_5 + 41293,21 X_6 X_7$
Heptacloro	$Y = 30759,85 + 16309,85 X_1 + 12427,81 X_2 + 12172,97 X_3 + 9255,708 X_4 X_5 + 14370,62 X_6 X_7$
Aldrin	$Y = 30680,05 + 14711,24 X_1 + 10298,04 X_2 + 9538,908 X_3 + 14380,12 X_4 X_5$
Heptacloro Epóxido	$Y = 57505,26 + 21321,32 X_1 + 25128,12 X_2 + 18311,2 X_3 + 21237,04 X_4 X_5$
α-Endosulfan	$Y = 25360,3 + 21210,14 X_1 + 22270,68 X_2 + 14157,34 X_3 + 16698,33 X_4 X_5 + 9107,833 X_6 X_7 + 14053,42 X_8 X_9 + 7955,626 X_{10}^2 + 8032,275 X_{11}^2 + 8918,696 X_{12}^2$
Dieldrin	$Y = 37068,76 + 19635,68 X_1 + 19550,11 X_2 + 17155,57 X_3 + 14620,37 X_4 X_5 + 14822,96 X_6 X_7 + 10075,76 X_8^2$
p,p'-DDE	$Y = 49202,94 + 24317,45 X_1 + 23908,28 X_2 + 21809 X_3 + 17552,71 X_4 X_5$
β-Endosulfan	$Y = 16372,21 + 19455,59 X_1 + 18455,59 X_2 + 19138,5 X_3 + 13208,79 X_4 X_5 + 12808,04 X_6 X_7 + 15437,79 X_8 X_9 + 10172,34 X_{10}^2 + 7662,475 X_{11}^2 + 9535,526 X_{12}^2$
p,p'-DDD	$Y = 13977,17 + 21094,44 X_1 + 19198,69 X_2 + 19916,94 X_3 + 14229,38 X_4 X_5 + 12528,71 X_6 X_7 + 16214,79 X_8 X_9 + 14829,57 X_{10}^2 + 14030,07 X_{11}^2 + 16629,52 X_{12}^2$
p,p'-DDT	$Y = 9805,075 + 15969,61 X_1 + 16922,5 X_2 + 15268,83 X_3 + 13769,46 X_4 X_5 + 11211,63 X_6 X_7 + 15521,46 X_8 X_9 + 11214,81 X_{10}^2 + 10824,95 X_{11}^2 + 11043,5 X_{12}^2$
Endrin	$Y = 22403,06 + 26387,92 X_1 + 24247,64 X_2 + 21052,92 X_3$
Biféntrín	$Y = 8486,784 + 4430,017 X_1 + 3674,498 X_2 + 3688,219 X_3 + 2842,083 X_4 X_5 + 3153,167 X_6 X_7$
Posalón	$Y = 13082 + 24621,76 X_1 + 27619,23 X_2 + 21444,71 X_3 + 21923,51 X_4^2 + 20019,11 X_5^2$
Fenarimol	$Y = 100807,4 + 40568,99 X_1 + 36143,28 X_2 + 35943,26 X_3 + 37752,2 X_4 X_5$
λ-Chlaltrotrín	$Y = 5560,746 + 12921,33 X_1 + 16355,86 X_2 + 13261,96 X_3 + 7265,417 X_4 X_5 + 10455,33 X_6 X_7 + 9697,838 X_8 X_9 + 10872,37 X_{10} X_{11} + 8950,425 X_{12} X_{13}$
Acrinatrín	$Y = 3969,293 + 8740,227 X_1 + 11343,48 X_2 + 11895,98 X_3 + 11782,46 X_4 X_5$
α-Cipermetrín	$Y = 6174,206 + 8632,032 X_1 + 11084,96 X_2 + 10940,31 X_3 + 8480,31 X_4 X_5 + 10036,42 X_6 X_7$

Modelos finales	
(b)	
PCB 1	$Y = 24227,16 + 13920,15 X_1 + 6159,556 X_2$
PCB 5	$Y = 12078,51 + 9824,282 X_1 + 7344,75 X_2 + 6085,916 X_3 + 4076,625 X_4 + 4706,875 X_5 X_6 + 2827,146 X_7^2$
PCB 29	$Y = 15560,12 + 9683,524 X_1 + 5272,937 X_2 + 5308,279 X_3$
PCB 28	$Y = 20236,07 + 19176,24 X_1 + 14080,84 X_2 + 13196,15 X_3 + 15845,5 X_4 X_5 + 11915,92 X_6 X_7 + 12549,75 X_8 X_9$
PCB 52	$Y = 12970,45 + 6938,61 X_1 + 5463,782 X_2 + 6699,263 X_3$
PCB 47	$Y = 11848,57 + 6562,202 X_1 + 4627,243 X_2 + 5232,478 X_3 + 3994,375 X_4 X_5$
PCB 98	$Y = 12026,18 + 6135,313 X_1 + 4507,483 X_2 + 3485,186 X_3 + 4770,583 X_4 X_5$
PCB 154	$Y = 13097,96 + 5429,514 X_1 + 4772,791 X_2 + 5051,26 X_3$
PCB 153	$Y = 19148,78 + 8478,14 X_1 + 7968,919 X_2 + 8185,625 X_3 + 8375,792 X_4 X_5$
PCB 138	$Y = 20205,55 + 9243,231 X_1 + 8569,879 X_2 + 7434,792 X_3$
PCB 171	$Y = 15996,4 + 7552,465 X_1 + 8083,911 X_2 + 7963,107 X_3 + 6674,042 X_4 X_5$
PCB 200	$Y = 12514,59 + 6128 X_1 + 5808,402 X_2 + 5735,872 X_3 + 4193,333 X_4 X_5$
(c)	
Modelos finales	
PBDE 28	$Y = 29764,67 + 13538,98 X_1 + 11775,23 X_2 + 10151,04 X_3 + 7414,208 X_4 X_5 + 9177,042 X_6 X_7$
PBDE 47	$Y = 25801,37 + 11656,1 X_1 + 9510,054 X_2 + 8182,086 X_3 + 6676,542 X_4 X_5$
PBDE 85	$Y = 19857,69 + 7781,062 X_1 + 6524,988 X_2 + 6512,441 X_3 + 6017,25 X_4 X_5$
PBDE 99	$Y = 20227,86 + 7261,868 X_1 + 6000,591 X_2 + 7372,105 X_3 + 4704,542 X_4 X_5 + 3978,292 X_6 X_7$
PBDE 100	$Y = 11716,39 + 4906,803 X_1 + 3224,73 X_2 + 4626,155 X_3$
PBDE 153	$Y = 13408,35 + 5444,998 X_1 + 3649,34 X_2 + 5199,905 X_3$
PBDE 154	$Y = 10933,67 + 4125,908 X_1 + 2576,463 X_2 + 2509,958 X_3$
PBDE 183	$Y = 7273,412 + 3187,563 X_1 + 3028,473 X_2 + 3520,247 X_3$

**Tabla 9.** Parámetros de calidad del método de extracción para (a) Plaguicidas, (b) PCBs y (c) PBDEs.

Análitos	Zumo de naranja		Tomate triturado		Plasma de sangre animal		Otros trabajos
	LODs (ng L <sup>-1</sup> )	Ef	LODs (ng L <sup>-1</sup> )	Ef	LODs (ng L <sup>-1</sup> )	Ef	
(a)							
β-HCH	18	44	82	135	45	86	10 <sup>a</sup>
γ-HCH	16	38	38	161	83	117	10 <sup>a</sup>
δ-HCH	20	45	59	154	22	63	15 <sup>a</sup>
Clortalonil	20	52	-	-	35	1	25 <sup>a</sup>
Heptacloro	10	43	150	142	75	112	10 <sup>a</sup>
Aldrín	13	41	164	132	58	115	75 <sup>a</sup>
Heptacloro	13	46	104	170	78	146	15 <sup>a</sup>
α-Endosulfan	19	41	157	133	49	112	15 <sup>a</sup>
Dieldrín	23	53	161	129	50	109	20 <sup>a</sup>
p,p'-DDE	18	44	107	121	60	109	10 <sup>a</sup>
β-Endosulfan	14	38	163	131	12	106	24 <sup>a</sup>
p,p'-DDD	19	52	151	122	34	89	25 <sup>a</sup>
p,p'-DDT	18	43	182	106	68	22	60 <sup>a</sup>
Endrín	19	52	151	140	66	110	15 <sup>a</sup>
Bifentrín	13	54	144	53	160	20	40 <sup>b</sup>
Posalón	15	58	134	107	71	45	50 <sup>c</sup>
Fenarimol	39	47	134	153	88	91	100 <sup>d</sup>
λ-Cihalotrín	19	56	163	117	56	53	2 <sup>e</sup>
Acrinatrín	23	53	173	81	33	24	3 <sup>e</sup>
α-Cipermetrín	12	60	152	66	54	42	50 <sup>a</sup>
(b)							
	LODs (ng L <sup>-1</sup> )	Ef	LODs (ng L <sup>-1</sup> )	Ef	LODs (ng L <sup>-1</sup> )	Ef	LODs (ng L <sup>-1</sup> )
PCB 1	42	51	85	57	69	52	100 <sup>f</sup>
PCB 5	16	31	80	91	53	81	200 <sup>f</sup>
PCB 29	17	60	75	100	31	68	120 <sup>f</sup>
PCB 28	19	26	61	138	12	118	24 <sup>g</sup>
PCB 52	24	58	126	76	80	69	16 <sup>g</sup>
PCB 47	30	51	163	103	61	88	100 <sup>f</sup>
PCB 98	23	42	163	97	60	65	100 <sup>f</sup>
PCB 154	18	55	167	107	40	88	100 <sup>f</sup>
PCB 153	16	28	145	118	42	101	21 <sup>g</sup>
PCB 138	15	31	134	116	29	109	16 <sup>g</sup>
PCB 171	13	40	181	126	80	98	40 <sup>f</sup>
PCB 200	15	36	162	100	52	84	100 <sup>f</sup>

(c)	LODs (ng L <sup>-1</sup> )	Ef	LODs (ng L <sup>-1</sup> )	Ef	LODs (ng L <sup>-1</sup> )	Ef	LODs (ng L <sup>-1</sup> )
PBDE 28	21	48	70	132	69	108	50 <sup>g</sup>
PBDE 47	19	28	88	143	59	134	54 <sup>g</sup>
PBDE 85	22	18	72	123	61	108	52 <sup>g</sup>
PBDE 99	21	19	62	128	56	111	52 <sup>g</sup>
PBDE 100	24	25	35	108	51	83	47 <sup>g</sup>
PBDE 153	9	13	54	115	72	104	53 <sup>g</sup>
PBDE 154	17	22	131	108	66	85	53 <sup>g</sup>
PBDE 183	28	22	169	76	76	64	105 <sup>g</sup>

Ef: Factor de enriquecimiento. <sup>c</sup> ref. [28], en zumo de manzana. Datos en ng g<sup>-1</sup>. <sup>f</sup> ref. [31], en agua.  
<sup>a</sup> ref. [26], en agua. <sup>d</sup> ref. [29], en agua. <sup>g</sup> ref. [32], en suero de sangre de oveja.  
<sup>b</sup> ref. [27], en agua. <sup>e</sup> ref. [30], en vegetales de hoja verde. Datos en ng g<sup>-1</sup>.

**Table 10.** Valores de recuperaciones relativas (%) para los analitos extraídos en muestras de (a) zumo de naranja, (b) tomate triturado y (c) plasma de sangre animal.

Analito	0,5 µg L <sup>-1</sup>		1 µg L <sup>-1</sup>		Analito	0,5 µg L <sup>-1</sup>		1 µg L <sup>-1</sup>	
	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)		Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)
β-HCH	86	12	82	15	PCB 1	114	11	104	8
γ-HCH	98	14	98	9	PCB 5	108	10	103	4
δ-HCH	89	13	90	11	PCB 29	97	5	98	6
Clortalonil	78	9	78	16	PCB 28	109	14	110	7
Heptacloro	93	16	95	15	PCB 52	96	12	100	9
Aldrín	106	7	98	9	PCB 47	96	1	100	13
Heptacloro Epóxido	105	14	100	7	PCB 98	101	14	101	9
α-Endosulfan	102	8	100	5	PCB 154	105	11	101	5
Dieldrín	104	9	107	11	PCB 153	104	10	98	12
p,p'-DDE	97	11	101	8	PCB 138	106	11	106	14
β-Endosulfan	108	7,0	109	6	PCB 171	104	12	103	12
p,p'-DDD	101	12	105	9	PCB 200	100	10	99	13
p,p'-DDT	105	8	100	8	PBDE 28	92	14	93	15
Endrín	112	10	122	10	PBDE 47	92	14	93	12
Bifentrín	75	11	69	12	PBDE 85	91	11	94	14
Posalón	101	14	90	13	PBDE 99	84	13	89	16

## Capítulo 1

Analito	0,25 µg L <sup>-1</sup>		0,75 µg L <sup>-1</sup>		Analito	0,25 µg L <sup>-1</sup>		0,75 µg L <sup>-1</sup>	
	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)		Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)
Fenarimol	106	14	107	14	PBDE 100	96	12	97	10
λ-Cihalotrín	101	13	103	13	PBDE 153	81	14	83	16
Acrinatrín	91	14	85	12	PBDE 154	94	16	95	14
α-Cipermetrín	98	10	101	11	PBDE 183	78	10	83	10

(b)

Analito	0,25 µg L <sup>-1</sup>		0,75 µg L <sup>-1</sup>		Analito	0,25 µg L <sup>-1</sup>		0,75 µg L <sup>-1</sup>	
	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)		Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)
β-HCH	120	13	93	8	PCB 1	90	11	86	12
γ-HCH	115	10	82	10	PCB 5	99	10	82	9
δ-HCH	94	15	80	12	PCB 29	98	13	88	13
Clortalonil	-	-	-	-	PCB 28	103	14	85	14
Heptacloro	79	12	81	13	PCB 52	108	10	109	9
Aldrín	82	9	83	10	PCB 47	84	10	89	12
Heptacloro Epóxido	85	18	88	17	PCB 98	85	14	92	12
α-Endosulfan	85	7	89	8	PCB 154	119	9	116	12
Dieldrín	81	10	84	12	PCB 153	80	11	94	14
p,p'-DDE	98	4	88	13	PCB 138	102	4	100	11
β-Endosulfan	78	11	86	13	PCB 171	94	8	85	13
p,p'-DDD	117	14	87	13	PCB 200	80	13	94	13
p,p'-DDT	88	12	81	15	PBDE 28	82	10	93	15
Endrín	81	11	84	8	PBDE 47	90	11	95	12
Bifentrín	82	17	120	12	PBDE 85	86	13	86	12
Posalón	84	11	80	12	PBDE 99	79	9	78	12
Fenarimol	93	16	85	13	PBDE 100	99	10	90	10
λ-Cihalotrín	87	14	88	15	PBDE 153	89	13	76	10
Acrinatrín	72	15	87	16	PBDE 154	110	11	83	10
α-Cipermetrín	74	15	90	11	PBDE 183	95	14	87	13

(c)

Analito	0,25 µg L <sup>-1</sup>		0,75 µg L <sup>-1</sup>		Analito	0,25 µg L <sup>-1</sup>		0,75 µg L <sup>-1</sup>	
	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)		Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)
β-HCH	97	6	112	11	PCB 1	122	14	121	11
γ-HCH	125	12	121	10	PCB 5	84	15	99	11
δ-HCH	98	10	102	12	PCB 29	106	12	106	12
Clortalonil	89	14	81	14	PCB 28	82	14	91	14
Heptacloro	82	15	97	14	PCB 52	99	12	91	11
Aldrín	109	9	91	7	PCB 47	90	11	84	12

## *Capítulo 1*

Analito	0,25 µg L <sup>-1</sup>		0,75 µg L <sup>-1</sup>		Analito	0,25 µg L <sup>-1</sup>		0,75 µg L <sup>-1</sup>	
	Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)		Rec. (%)	RSD (%)	Rec. (%)	RSD (%)
Heptacloro Epóxido	101	17	91	17	PCB 98	111	10	105	13
α-Endosulfan	80	13	91	13	PCB 154	81	11	101	10
Dieldrín	78	13	88	12	PCB 153	96	13	93	12
p,p'-DDE	104	10	97	10	PCB 138	96	11	92	11
β-Endosulfan	100	8	103	12	PCB 171	106	5	98	9
p,p'-DDD	91	11	93	13	PCB 200	113	10	94	10
p,p'-DDT	90	13	87	14	PBDE 28	77	11	97	12
Endrín	80	13	91	11	PBDE 47	102	14	95	7
Bifentrín	65	17	78	15	PBDE 85	87	14	85	12
Posalón	106	4	99	7	PBDE 99	86	14	84	10
Fenarimol	113	8	114	10	PBDE 100	98	5	87	11
λ-Cíhalotrín	106	10	93	13	PBDE 153	78	12	77	12
Acrinatrín	109	13	96	11	PBDE 154	71	12	74	14
α-Cipermetrín	102	13	95	10	PBDE 183	69	12	65	14

### Referencias

- [1] Covaci, A., Voorspoels, S., de Boer, J., *Environ. Int.*, 29 (2003) 735-756.
- [2] Gómara, B., García-Ruiz, C., González, M. J., Marina, M. L., *Anal. Chim. Acta*, 565 (2006) 208-213.
- [3] Patlak, M., *Environ. Sci. Technol.*, 30 (1996) 210-211.
- [4] Dewailly, E., Nantel, A., Weber, J. P., Meyer, F., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 43 (1989) 641-646.
- [5] Basheer, C., Lee, H. K., Obbard, J. P., *J. Chromatogr. A*, 1022 (2004) 161-169.
- [6] Alaei, M., Arias, P., Sjödin, A., Bergman, A., *Environ. Int.*, 29 (2003) 683-689.
- [7] Basheer, C., Lee, H. K., Obbard, J. P., *J. Chromatogr. A*, 968 (2002) 191-199.
- [8] Basheer, C., Suresh, V., Renu, R., Lee, H. K., *J. Chromatogr. A*, 1033 (2004) 213-220.
- [9] Marsin-Sanagi, M., Zainal-Abidin, N. A., Wan-Ibrahim, W. A., Aboul-Enein, H. Y., *Chromatographia*, 71 (2010) 461-467.
- [10] Garrido-Frenich, A., Romero-González, R., Martínez-Vidal, J. L., Martínez-Ocaña, R., Baquero-Feria, P., *Anal. Bioanal. Chem.*, 399 (2011) 2043-2059.
- [11] Fontanals, N., Barri, T., Bergström, S., Jönsson, J. Å., *J. Chromatogr. A*, 1133 (2006) 41-48.
- [12] Sarafraz-Yazdi, A., Amiri, A., *Trends Anal. Chem.*, 29 (2010) 1-14.
- [13] Ghambarian, M., Yamini, Y., Esrafil, A., Yazdanfar, N., Moradi, M. J., *Chromatogr. A*, 1217 (2010) 5652-5658.
- [14] Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K. E., *Anal. Chem.*, 71 (1999) 2650-2656.
- [15] Box, G. E. P., Wilson, K. B., *J. Roy. Stat. Soc. Ser. B*, 13 (1951) 1-45.
- [16] Otto, M. "Chemometrics. Statistics and computer application in Analytical Chemistry", Willey-VCH (ed.) (1999) Alemania.
- [17] Box, G. E. P., Hunter, J. S., *Ann. Math. Stat.*, 28 (1957) 195-241.
- [18] Gómez-Ariza, J. L., García-Barrera, T., Lorenzo, F., *J. Anal. At. Spectrom.*, 20 (2005) 883-888.
- [19] Gómez-Ariza, J. L., García-Barrera, T., *J. Anal. At. Spectrom.*, 21 (2006) 884-890.
- [20] Xiao, Q., Hu, B., Duan, J., He, M., Zu, W., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 18 (2007) 1740-1748.
- [21] Chen, P-S., Huang, S-D., *Talanta*, 69 (2006) 669-675.
- [22] Boyd-Boland, A. A., Pawliszyn, J. B., *J. Chromatogr. A*, 704 (1995) 163-172.
- [23] Howard, P. H., Meylan, W. M., "Handbook of Physical Properties of Organic Chemicals" Boca Raton: CRC Press-Lewis Publishers (ed.) (1997).
- [24] Basheer, C., Balasubramanian, R., Lee, H. K., *J. Chromatogr. A*, 1016 (2003) 11-20.
- [25] Gómez-Ariza, J. L., García-Barrera, T., Lorenzo, F., Gustavo-González, A., *Anal. Chim. Acta*, 540 (2005) 17-24.
- [26] EPA Method 508 (Revision 3.1), EPA-600/R-95/131, (1995) Washington, USA.
- [27] EPA Method 527 (Revision 1.0), EPA-815/R-05/005, (2005) Washington, USA.

## *Capítulo 1*

---

- [28] Cunha, S. C., Fernandes, J. O., Oliveira, M. B. P. P., J. Chromatogr. A, 1216 (2009) 8835-8844.
- [29] EPA Method 525.2 (Revision 2.0), EPA-600/R-95/131, (1995) Washington, USA.
- [30] González-Rodríguez, R. M., Rial-Otero, R., Canho-Grande, B., Simal-Gándara, J., J. Chromatogr. A, 1196 (2008) 100-109.
- [31] EPA Method 525.1 (Revision 2.2), EPA-600/4-88/039, (1991) Washington, USA.
- [32] Zhang, Z., Rhind, S. M., Talanta, 84 (2011) 487-493.

## Capítulo 1 (Artículo Científico)

Del apartado “Capítulo 1” de esta tesis ha sido retirado el artículo referenciado más abajo debido a restricciones relativas a los derechos de autor.

Referencias bibliográficas:

- Manso, J., García Barrera, T., Gómez Ariza, J.L.: “ New home-made assembly for hollow-fibre membrane extraction of persistent organic pollutants from real world samples”. Journal of Chromatography A, Nov 4;1218(44):7923-35. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.09.023

Enlace del artículo en la revista:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21962495>



## *Capítulo 2*

---



### **Chapter 2. A multiple hollow fibre-liquid phase microextraction method for the determination of halogenated solvent residues in edible oils**

#### **Abstract**

The presence of halogenated solvent residues in edible oils is caused by the extraction process to obtain the oil and has a great negative influence in both human health and quality of oil. The European Commission establishes a restrictive regulation in 2003 related with the maximum content of compounds for all categories of olive oils. This fact makes mandatory the development of new analytical methods for the determination of halogenated solvents in edible oils to protect human health and to guarantee food quality that should be simple and cheap to allow their use in routine laboratories for food quality control. The method described in this paper is based on the extraction of analytes by multiple hollow-fibre liquid phase microextraction and detection by ion-trap mass spectrometry and electron capture detectors after gas chromatographic separation. The limits of detection of the analytical method are below  $\text{mg kg}^{-1}$  with three orders of magnitude of linear range. The recoveries of all the analytes in fortified edible oils ranged from 80-100% and the relative standard deviation below 15%. The main advantages of the analytical method are the absence of sample carryover (due to the disposable nature of the membranes), high analyte enrichments with enrichment factors in the range of 79-488, high throughput and low cost.

The results shown in this chapter have been accepted for publication in: Manso-Sayago, J. M., García-Barrera, T., González, G. A., "A multiple hollow fibre-liquid phase microextraction method for the determination of halogenated solvent residues in edible oils", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2014 (Manuscript N°. ABC-01823-2013.R1).

### 1. Introduction

Olive oil has multiple health benefits due to its high content in unsaturated fatty acids and antioxidant substances. These benefits explain that olive oil is a principal constituent in the Mediterranean diet with high nutritional and economic value. In this sense, the International Olive Council (IOC) reports that the production of olive oil in the last five years reached 2.894.000 tons over the world being 73% produced in the Mediterranean area [1]. This fact makes mandatory an exhaustive quality control and authentication of olive oil to protect human health as well as to avoid frauds.

Halogenated solvents are employed to extract crude olive-pomace oils from the solid residue obtained during the pressing of olive oils [2]. Generally, naphtha, aliphatic hydrocarbons such as n-hexane, halogenated compounds such as trichloromethane, tetrachloromethane, trichloroethylene and others are used. The preparation of edible oils using solvent extraction is cheaper than forcing oil but the quality of oil is lower and it can be harmful to human health because of the presence of solvent residues [3]. Recent investigations indicate also that chloro-derived organic solvents usually emerge from incomplete tank and cistern cleaning during a multi-step cleaning process. Fat is better dissolved with the aforementioned compounds; therefore a very important step in tank preparation for oil is careful rinsing of the tank with water [4]. The EU [5] established the parameters for olive oil quality which limit the presence at levels below  $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$  (individual compounds) and  $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$  (total content).

Because of the high volatility of these solvents, the analytical methods are mainly based in the isolation of compounds from this matrix by headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and further analysis by gas chromatography coupled to electron-capture detector (ECD) [6, 7], mass spectrometry (MS) [8], or both ECD and inductively coupled plasma mass spectrometry (ECD-ICP-MS) [9].

HS-SPME is the usual extraction method of choice for the analysis of halogenated solvents in edible oils because it is simple, efficient, fast and solvent-free, overcoming matrix effects. However, membrane based extraction techniques have become a promising alternative against canonical analytical extraction techniques or more recent miniaturised techniques as solid phase microextraction (SPME) and liquid phase microextraction (LPME). Hollow-fibre (HF) membrane extraction techniques are mainly related with the use of hydrophobic membranes that are porous or non-porous polymeric materials. There are several configurations of HF but HF-LPME introduced by Pedersen-Bjergaard and Rasmussen overcomes the majority of problems related with this type of extraction [10-12]. Miniaturised

membrane based extraction techniques have several important advantages such as reproducibility, absence of sample carryover (due to the disposable nature of the membranes), high analyte enrichments, high throughput, low cost, applicability to many different types of analytes, large pH tolerance range and facility for automation and conversion into greener analytical techniques. Until now, HF methods and their modifications have been widely used to efficiently extract pollutants from food, biological and environmental samples [13-15].

In addition, multiple hollow-fibre (MHF) can increase the capabilities of HF since it implies a step-wise extraction procedure from a single sample. In this way, the concentration of the analyte decays exponentially and the total peak area, corresponding to an exhaustive extraction of the analyte, can be calculated as the sum of areas of each individual extraction. The main advantage is that the matrix effect can be overcome and calibration can be performed in aqueous solutions even if solid matrixes are analysed [16]. Multiple headspace (MHS) using SPME [9, 16, 17] and single-drop microextraction (SDME) [18-21] have been previously described in the literature. In addition, two-step liquid-liquid-liquid microextraction has been proposed for the analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs in wastewaters [22], but in this case, two different membrane extraction approaches were combined.

In the present paper, a new method for the determination of halogenated solvents in edible oils has been optimized using MHF-LPME followed by gas chromatography with ECD and MS detection. For this purpose, six important halogenated solvents have been selected: bromoform ( $\text{CHBr}_3$ ), chloroform ( $\text{CHCl}_3$ ), trichloroethene ( $\text{C}_2\text{HCl}_3$ ), tetrachloroethene ( $\text{C}_2\text{Cl}_4$ ), dibromochloromethane ( $\text{CHBr}_2\text{Cl}$ ) and bromodichloromethane ( $\text{CHBrCl}_2$ ). The method is simple and applicable to complex matrices with high reproducibility and enrichment factors for all the analytes, which can be detected under the limits established by the UE.

## **2. Experimental**

### **2.1. Standard solutions, reagents and samples**

All reagents used were of highest purity. Isooctane, cyclohexane, n-decane and acetone were obtained from Teknokroma (Barcelona, Spain). 1-octanol and toluene were supplied by Merck (Darmstadt, Alemania). Methanol and n-hexane were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). Ultrapure water (18 M $\Omega$  cm)

was obtained from a Milli-Q water-purification system and was used throughout (Millipore, Watford, UK).

Chloroform (99.9%), trichloroethene (99.9%), tetrachloroethene (99.9%), dibromochloromethane (98.7%), bromodichloromethane (99 %) and bromoform (99%) were obtained from Aldrich (Steinheim, Germany). Individual standard solutions ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ) were prepared by exact weighting of pure compounds and dissolution in hexane. Working solutions for direct injection and spiking experiments were prepared by dilution of the standard solutions with hexane. All standard solutions were stored in vials without headspace at  $-22^{\circ}\text{C}$  until analysis. Ultrapure water ( $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ) obtained from a Milli-Q system (Millipore, Waford, UK) was used throughout.

Olive oil samples were purchased from a local supermarket.

### 2.2. Instrumentation

Analyses were carried out using a 6890N GC- $\mu$ ECD (Hewlett Packard (HP), Wilmington, USA) with a Chrompack CPSIL-24 chromatographic column ( $30\text{m} \times 0,25\text{mm} \times 0,25 \mu\text{m}$ ). Carrier gas was helium at a flow-rate of  $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ . The oven temperature was optimized and programmed at  $40^{\circ}\text{C}$  for 1 min, subsequently increased to  $200^{\circ}\text{C}$  at  $85^{\circ}\text{C min}^{-1}$  held for 1,12 min. The make up gas was  $\text{N}_2$  at  $50 \text{ mL min}^{-1}$  and detector temperature was set at  $280^{\circ}\text{C}$ . The injector temperature was set at  $280^{\circ}\text{C}$ .

Samples were simultaneously analysed in a gas chromatograph model Trace GC Ultra equipped with an ion trap (model ITQ 900, Thermo Fisher Scientific SpA, Rodano, Milan, Italy). The chromatographic conditions were the same above described and transfer line temperature was set at  $200^{\circ}\text{C}$ . Data acquisition was carried out in the electron impact (EI) mode at 70 eV. For selected ion monitoring (SIM), the following ions were chosen (relative intensity in parenthesis): (i) Chloroform: m/z 47:50 (29); 82:86 (100); 118:120 (6); (ii) Trichloroethene: m/z 60:62 (50); 95:97 (96); 130:134 (100); (iii) Bromodichloromethane: m/z 47:49 (19); 127:131 (14); 80:84 (100); (iv) Tetrachloroethene: m/z 94:98 (35); 129:135 (74); 164:170 (100); (v) Dichloromethane: m/z 79:86 (9); 127:131 (100), (vi) Bromoform: m/z 79:81 (11); 171:175 (100); 250:253 (18).

### 2.3. Multiple Hollow Fibre-Liquid Phase Microextraction

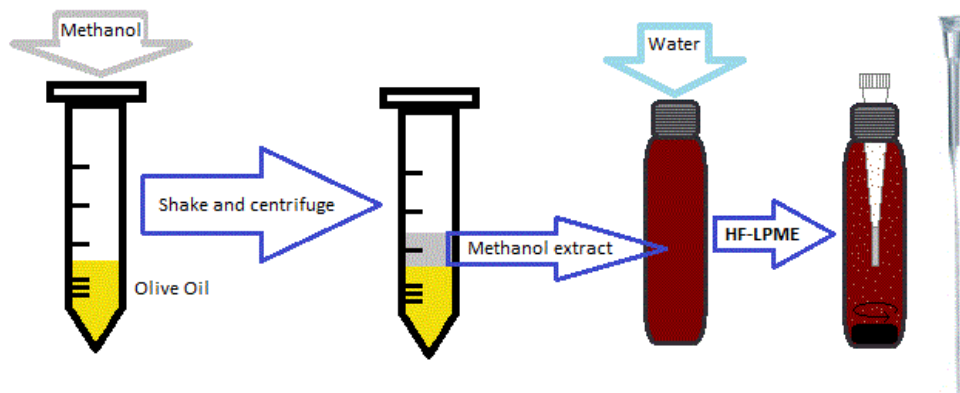
The extraction procedure is illustrated in Figure 21. A mixture of methanol (total volume of 10 mL) and 10,00 g of olive oil was placed in a centrifuge tube. After that, the mixture was shaken until the cloud point was observed, and then centrifuged at 7000 rpm for 3 minutes allowing a complete separation of the phases. The polar phase (methanol extract) was placed into a 20 mL vial with 15 mL of ultrapure water and analytes were extracted by MHF-LPME.

The porous hollow fibre used to support the organic phase and for containing the acceptor solution was Q3/2 polypropylene (Accurel Q3/2, Membrana, Wuppertal, Germany) with an internal diameter of 600  $\mu\text{m}$ , 200  $\mu\text{m}$  of wall thickness and 0,2  $\mu\text{m}$  pores. The extraction procedure used has been published elsewhere [15] with several modifications. Briefly, the assembly consists of an Eppendorf GELoader pipette tip for filling microinjection capillaries with a volume range of 0,5-20  $\mu\text{L}$  (Eppendorf, Hamburg, Germany), 3 cm of HF membrane and a 20 mL vial covered with a septum (20 mm diameter and 3 mm thickness, PTFE/silicone (Supelco, Bellefonte, PA, USA). First of all, the HF is cut and one end closed by means of a hot soldering tool. The pipette tip end is cut allowing a perfect connection with the open end of the membrane and then, the HF is introduced in the extraction solvent (n-hexane) during 1 minute to open the pores. Using a 500  $\mu\text{L}$  volume GC syringe (Hamilton, Supelco, Bellefonte, PA, USA) the air is removed from the lumen of the membrane and filled with the solvent contained in the vial. Immediately, the HF-tip pipette assembly is introduced into a vial containing 5 mL of sample extract (methanol) plus 15 mL of ultrapure water. The extraction is carried out during 3 minutes at 25°C and 700 rpm. After that, the sealed end of the HF is cut and 1  $\mu\text{L}$  of hexane with the analytes is extracted from the membrane through the tip of micropipette using a 10  $\mu\text{L}$  syringe for the GC analysis.

For MHF-LPME, exponential decays of the analytes with the successive extractions were calculated by plot the total area versus the analytes mass using solutions of the analytes in vegetable oil. Three repeated extractions were performed per solution and the total area was calculated using the linear regression of the logarithms of the individual peak areas (Equation (24) and (25), where “ $A_1$ ” is the peak area of the first extraction and “ $\beta$ ” is calculated from linear regression of the logarithms of the individual peak areas) [9, 16, 17].

$$A_T = \frac{A_1}{1 - \beta} \quad (24)$$

$$\ln A_i = (i - 1)\ln \beta + \ln A_i \quad (25)$$



**Figure 21.** Extraction procedure with the HF-LPME assembly. The insert shown the Eppendorf GELoader pipette tip used.

### 3. Results and discussion

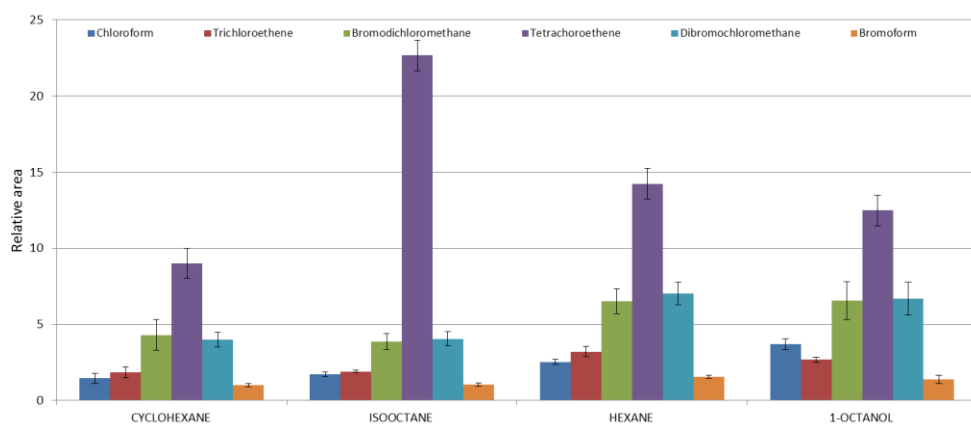
#### 3.1. Optimization of the HF-LPME method

Initially, olive oil samples were directly extracted by MHF-LPME but, due to the complexity of the samples, the procedure was considerably enhanced with a previous extraction with methanol. In this way, several procedures were assayed using manual shaking, ultrasound extraction and centrifugation as well as different solvents like methanol, ethanol and 2-propanol. Better results were obtained with methanol as extraction solvent and centrifugation in relation with peak areas and absence of interferences.

The most important variables affecting the HF-LPME extraction are the following: extraction solvent, extraction time, stirring speed, ionic strength, temperature, pH and membrane length. An univariate optimization of each variable was carried out and the analysis ( $n=3$ ) was performed under fixed conditions of the other as follows: extraction time (5 min), stirring speed (700 rpm), ionic strength (0% NaCl), temperature (25°C), pH (4,6) and HF length (3 cm).

### 3.1.1. Choice of extraction solvent

Seven different solvents were tested for the extraction of analytes: acetone, toluene, decane, hexane, isooctane, cyclohexane and 1-octanol. The preconcentration of analytes is only possible with the four last solvents. Figure 22 shows the effect of solvents used for HF-LPME on the peak area of analytes. It can be observed that preconcentration of tetrachloroethene is very efficient using any of these solvents but especially with isooctane. However, a compromise is adopted for all the analytes using hexane as extraction solvent that was selected for further

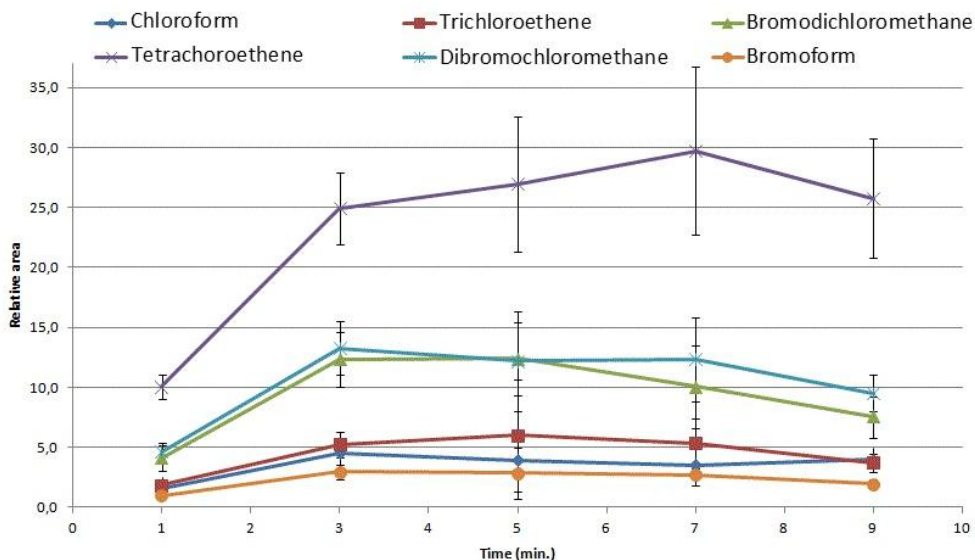


experiments.

**Figure 22.** Effect of the extraction solvents used for HF-LPME in the peak area of organohalogen solvent. The error bars indicate the standard deviation ( $n=3$ ). Relative peak area = peak area/first peak area corresponding to the lowest experimental value of the abscissa.

### 3.1.2. Extraction time

The extraction time was optimized from 1 to 10 minutes [Figure 23]. Although, some improvement in the peak areas can be observed after 3 minutes, especially in the case of tetrachloroethene, the repeatability is very poor and for this reason the extraction time was set at 3 minutes for further experiments.



**Figure 23.** Effect of the extraction time for HF-LPME in the peak area of organohalogen solvents. The error bars indicate the standard deviation (n=3). Relative peak area = peak area/first peak area corresponding to the lowest experimental value of the abscissa.

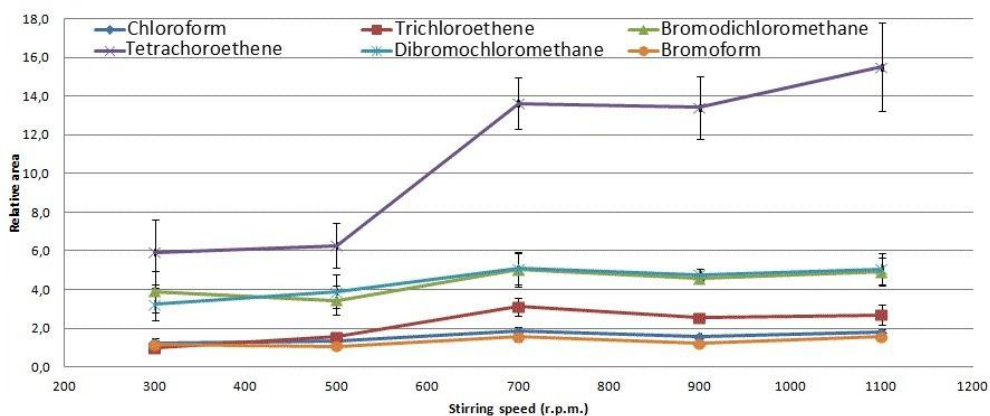
### 3.1.3. Stirring speed

The extraction process is based on analyte diffusion from the sample to the acceptor solvent inside the HF. For this reason, increases of sample stirring could reduce the time to get the partition equilibrium. Stirring speeds from 300 rpm to 1100 rpm were assayed and results are shown in Figure 24. It can be observed that increasing stirring speed enhances extraction yield of all the analytes, until 700 rpm and in the case of tetrachloroethene until 1100 rpm. However, air bubbles appear inside the membrane using high stirring speeds, which has detrimental effects in analysis reproducibility. Therefore, a compromise value was set at 700 rpm for further experiments.

### 3.1.4. Ionic strength

Increasing of ionic strength affects the diffusion coefficients of the analytes and for this reason the presence of NaCl in the sample was studied from 0 to 30% (w/v),

although this factor does not contribute significantly to the extraction of the analytes and enhances the extraction of interferences. Therefore, the addition of NaCl was not considered later.



**Figure 24.** Effect of the stirring speed used for the HF-LPME in the peak area of organohalogen solvents. The error bars indicate the standard deviation ( $n=3$ ). Relative peak area = peak area/first peak area corresponding to the lowest experimental value of the abscissa.

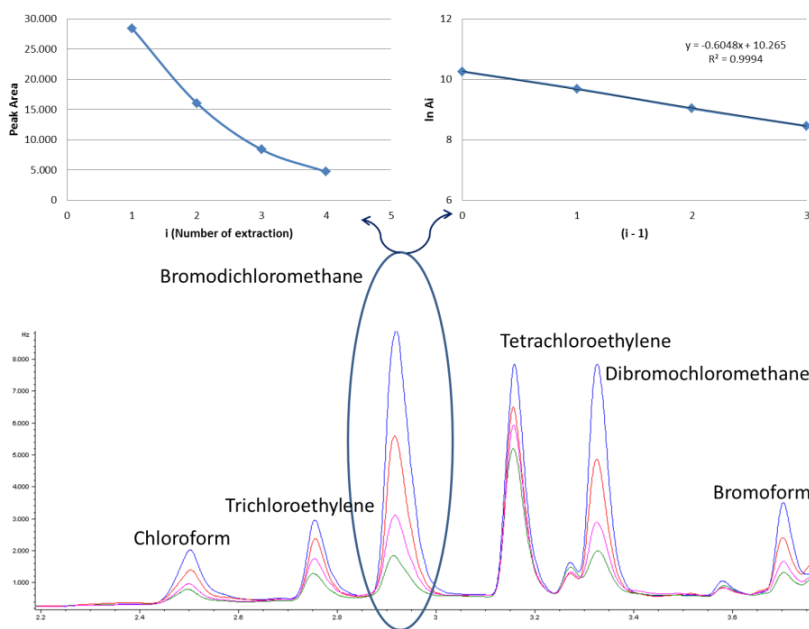
### 3.1.5. Temperature, pH and membrane length

The temperature, pH and membrane length do not influence significantly the peak areas of the analytes and these variables were set at 25°C, pH of the sample and 3 cm, respectively.

### 3.2. Performance of the method

Table 11 collects the parameters of quality of HF- and MHF-LPME. With HF-LPME, all the analytes (except tetrachloroethene) showed exponential decay of the peaks areas, and the corresponding correlation coefficients ( $R^2$ ) of the linear plot  $\ln A_i$  versus  $(i-1)$  obtained were in all the cases higher than 0,99. As above mentioned,

tetrachloroethene response was considered as non-linear since it showed an increase of the  $\ln A_i$  value while increasing  $(i-1)$ . Therefore, it cannot be quantified by MHS-SPME. Figure 25 shows overlapped chromatograms of four subsequent extractions of the analytes at  $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$  using HF-LPME. At the top of Figure 25 are shown two insides with the exponential decay obtained for bromodichloromethane; it can be observed very good correlation coefficient of the linear plot  $\ln A_i$  versus  $(i-1)$ .



**Figure 25.** Chromatograms obtained from a mix halogenated solvent solution in blank olive oil at  $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$  using MHF-LPME and analysis by GC-ECD. At the top the exponential decay of bromodichloromethane is showed as an example.

Linear ranges for calibration curves were obtained from the detection limits to  $400 \mu\text{g kg}^{-1}$  for all the analytes with correlation coefficients higher than 0,999. The detection and quantification limits (LODs and LOQs, respectively) were calculated with the data generated in the linearity studies. After reshaping the calibration function, LOD and LOQ were calculated as the analyte concentration that corresponds to a signal equal to " $a + 3 Sy/x$ " and " $a + 10 Sy/x$ " respectively, where " $a$ " is the origin ordinate, and " $Sy/x$ " indicates the random errors for the slops.

As can be seen in Table 11, the LODs using HF-LPME ranged from 0,75 to 1,5  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  and using MHF-LPME, from 0,13 to 0,67  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ , which demonstrate the higher sensitivity of the MHF method.

The relative standard deviations (%RSD) of ten sequential injections of the analytes at 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$  were lower than 17% in all the cases (Table 11). The extraction is driven by the difference in the chemical potential of analytes in organic solvent and in aqueous solution, which is described as a partition coefficient. In many cases, the octanol-water partition coefficient ( $\text{Log } K_{ow}$ ) is considered as an estimate for the partition coefficient in LPME, even if the organic solvents used is other than octanol. To evaluate the enrichment factor obtained with the HF-LPME assembly, the Equation (19) was used, where  $V_a$  is the volume of aqueous phase,  $V_d$  the volume of organic phase,  $C_a$  and  $C_o$  the concentration of analyte in the aqueous and organic phases, respectively,  $K_D$  is the partition coefficient between the organic acceptor phase and the aqueous donor (sample) phase, and the fraction of the analytes that are in extractable form is  $\alpha_D$  (for non-chargeable compounds  $\alpha_D = 1$ ) [23]. The enrichment factors for 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$  have been calculated for all the analytes and the data are collected in Table 11.

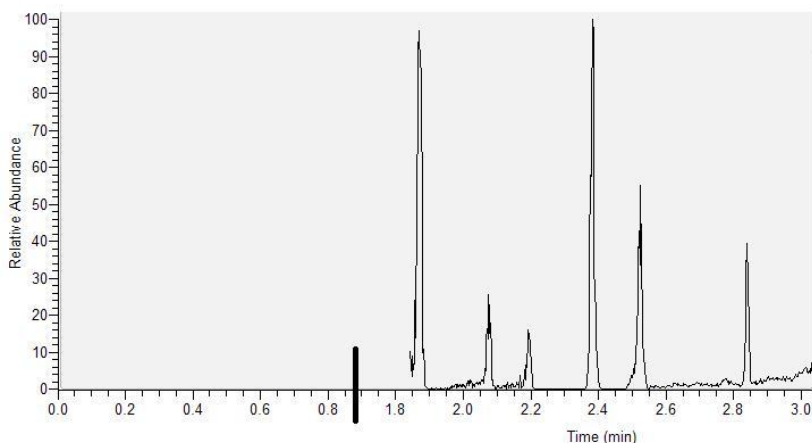
**Table 11.** Features of the HF-LPME and MHF-LPME methods for the extraction of halogenated solvents. Recovery values (%) for the analytes extracted from fortified olive oils.

Name	LOD ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ )		Log $k_{ow}$	Ef	RSD (%) n = 5	Recovery (%)
	HF-LPME	MHF-LPME				MHF-LPME
Chloroform	1,28	0,67	1,94	79	13	80
Trichloroethylene	1,44	0,44	2,57	257	11	80
Bromodichloromethane	1,38	0,13	2,04	97	11	100
Tetrachloroethene	0,75	-	3,07	488	15	<sup>a</sup> 66
Dibromochloromethane	1,35	0,19	2,21	136	13	92
Bromoform	1,5	0,24	2,44	207	11	86

<sup>a</sup>Data obtained with HF-LPME.

### 3.3. Application to real samples

Averaged recoveries of all the analytes were measured for the developed method. For this purpose, ten blank oils were fortified with  $100 \mu\text{g Kg}^{-1}$  of the analytes. The relative recoveries were determined as the ratio of the concentrations found in ultrapure water and fortified samples at the same concentration. Results obtained shows good recoveries for all the analytes that were in the range of 80-100%. The recovery of tetrachloroethene was calculated using HF-LPME and is 66%. Results are summarized in Table 11. Figure 26 shows a chromatogram of olive oil fortified at  $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$  of the analytes. Twenty five commercial olive oil samples were analysed with this method including five samples of virgin olive oil, ten refined olive oils and ten olive-pomace oils. According to the olive oil production process, the halogenated solvents could be present in the olive-pomace oil samples but the analytes were under the detection limits in all the samples.



**Figure 26.** Chromatogram obtained by GC-(SIM)-MS from an olive oil fortified with  $10 \mu\text{g Kg}^{-1}$  of each analyte.

## 4. Conclusions

The new analytical approach described in this paper constitutes a powerful tool to determine halogenated solvent residues in edible oils, with sensitivities under the limits established by the EU for this kind of samples.

In addition, unequivocal identification of analytes is obtained by MS detection even if they are coeluting with other compounds present in the oils. HF-LPME is

cheap and overcome the use of organic solvents needed in canonical extraction techniques like Soxhlet extraction. On the other hand, sample throughput is considerably high. The absence of sample carryover (due to the disposable nature of the membranes) and high reproducibility are the main advantages of the present method in comparison with SPME. The stepwise extraction proposed in this work eliminates a matrix effect and decreases the limits of detection that is a critical point in the analysis of edible oil. Finally, the approach is very simple and can be used in routine analysis of halogenated solvents in edible oils to assure their quality to consumers.

### References

- [1] Arrebola, F. J., Conzález-Rodríguez, M. J., Garrido-Frenich, A., Marín-Juan, A., Martínez-Vidal, J. L., *Anal. Chim. Acta*, 552 (2005) 60-68.
- [2] Production of pomace olive oil (2006) Digital CSIC  
<http://digital.csic.es/bitstream/10261/2464/1/Orujo.pdf>.
- [3] Ligor, M., Buszewski B., *J. Sep. Sci.*, 31 (2008) 364-371.
- [4] Gromadzka, J., Wardencki, W., *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 61 (2011) 33-43.
- [5] Commission Regulation (EC) (2003) Official Journal of the European Union L295 N° 1989/2003: 57.
- [6] Commission 2568/91: Regulation (EC) (1991) Official Journal of the European Union L248 N° Annex XI.
- [7] Michulec, M., Wardencki, W., *J. Chromatogr. A*, 1071 (2005) 119-124.
- [8] Page, B. D., Lacroix, G., *J. Chromatogr. A*, 873 (2000) 79-94.
- [9] Gómez-Ariza, J. L., García-Barrera, T., *J. Anal. At. Spectrom.*, 21 (2006) 884-890.
- [10] Barri, T., Jönsson, J. A., *J. Chromatogr. A*, 1186 (2008) 16-38.
- [11] Han, D., Row, H. K., *Mikrochim Acta*, 176 (2012) 1-22.
- [12] Ghambarian, M., Yamini, Y., Esrafil, A., *Mikrochim Acta*, 177 (2012) 271-294.
- [13] Sarafraz-Yazdi, A., Amiri, A., *Trends Anal. Chem.*, 29 (2010) 1-14.
- [14] Asensio-Ramos, M., Ravelo-Pérez, L. M., González-Curbelo, M. A., Hernández-Borges, J., *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 7415-7437.
- [15] Manso J., Gómez-Ariza, J. L., García-Barrera, T., *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 7923-7935.
- [16] Ezquerro, O., Pons, B., Tena, M. T., *J. Chromatogr. A*, 999 (2003) 155-161.
- [17] Gómez-Ariza, J. L., García-Barrera, T., Lorenzo, F., Beltrán, R., *J. Chromatogr. A*, 1112 (2006) 133-140.
- [18] Chai, X. S., Zhong, J. F., Hu, H. C., *J. Chromatogr. A*, 1238 (2012) 128-131.
- [19] Chai, X. S., Dong, C., Deng, Y., *Anal. Chem.*, 80 (2008) 7820-7825.
- [20] Bicchi, C., Ruosi, M. R., Cagliero, C., Cordero, C., Liberto, E., Rubiolo, P., Sgorbini, B., *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 753-762.
- [21] Hakkarainen, M., *Biochem J Biophys. Methods*, 70 (2007) 229-233.
- [22] Wen, X., Tu, C., Lee, H. K., *Anal. Chem.*, 76 (2004) 228-232.
- [23] Jönsson, J. Å., "Handbook of Membrane Separations. Chemical, Pharmaceutical, Food, and Biotechnological Applications, 1st ed.", Pabby et al. (ed.) (2009) Tarapur, India.

## *Capítulo 3*

---



### **Capítulo 3. Determinación de 4-isobutilacetofenona y otros productos de degradación de NSAIDs en aguas residuales y lodos de depuradoras**

#### **Resumen**

Este trabajo describe el desarrollo y optimización de un método de microextracción en fase líquida con membrana de fibra hueca, en la modalidad de dos fases, para la determinación de tres productos de transformación hidrofóbicos de los fármacos anti-inflamatorios no esteroideos ketoprofeno, ibuprofeno y diclofenaco: 3-acetobenzofenona, 4'-isobutilacetofenona y diclofenaco amida. El método de extracción optimizado utilizado consiste en la extracción de los analitos durante 180 minutos a una velocidad de agitación de 440 rpm. Se emplearon fibras huecas de polipropileno Q3/2 de 6 cm de longitud y el disolvente 1-octanol fue la fase aceptora orgánica. Los extractos se analizaron mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas y los límites de detección del método se encuentran en el rango de 10,5 a 41,1 ng L<sup>-1</sup>. El método se aplicó a la determinación de analitos en muestras del influente de cinco plantas de tratamiento de aguas residuales suecas (WWTPs). Los tres analitos se encuentran en concentraciones muy bajas o no detectables en las muestras analizadas. El compuesto más abundante fue 3-acetobenzofenona encontrado en cuatro de las WWTPs investigadas en una concentración media de 62 ng L<sup>-1</sup>. Diclofenaco amida y 4'-isobutilacetofenona sólo se detectaron por encima del límite de detección en una de las plantas a una concentración de 55 y 197 ng L<sup>-1</sup>, respectivamente. También se recogieron muestras de agua de entrada y salida del tratamiento de lodos activados, así como lodos digeridos de una de las plantas. Sólo diclofenaco amida se detectó en estas muestras. Se detectó una concentración más alta en el efluente que en el influente del tratamiento de lodos activados, indicando, de este modo, la formación de este compuesto durante el tratamiento. En el lodo, diclofenaco amida se detectó a 129 ng g<sup>-1</sup> (de peso húmedo). En base a estos resultados se puede concluir que las concentraciones de estos compuestos que llegan a las plantas de tratamiento de aguas residuales son muy pequeñas, lo que sugiere un riesgo despreciable para el medio ambiente acuático. Sin embargo, también indican la posible formación durante el proceso de tratamiento de lodos activados y la acumulación en los lodos de, al menos, uno de los compuestos estudiados. Por tanto, resulta imprescindible la realización de estudios en profundidad acerca de la evaluación del riesgo medioambiental de estos contaminantes emergentes.

### *Capítulo 3*

---

Los resultados que se describen en este Capítulo, han sido enviados para su publicación en: Manso, J. Larsson, E., Jönsson, J. Å., "Determination of 4'-isobutylacetophenone and other transformation products of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in water and sludge from five wastewater treatment plants in Sweden", *Talanta*, 2013. El trabajo experimental ha sido realizado en Lund (Suecia) durante tres meses.

### 1. Introducción

Cada año se introducen en el medio ambiente un amplio número de compuestos farmacéuticos y sus metabolitos, poniendo en peligro la salud de los ecosistemas acuáticos y terrestres. En los últimos años, el interés en relación con la aparición y la toxicidad de estos compuestos ha crecido considerablemente [1-4]. Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs) pertenecen al grupo de los fármacos más estudiados y su presencia en el medio ambiente ha despertado gran interés entre los investigadores [5-8]. Sin embargo, estos fármacos además de su toxicidad despiertan cada vez más interés porque son transformados por el metabolismo humano/animal o por las condiciones ambientales, dando lugar a productos de transformación más persistentes y/o más peligrosos que los compuestos parentales [9-10]. Por lo tanto, es necesario obtener la máxima información posible de los compuestos parentales, así como de sus posibles productos de transformación. Hasta la actualidad, se han identificado Más de 10 productos de transformación del ibuprofeno [11-13], de los cuales el 4'-isobutilacetofenona (4-IBAP) es uno de los más importantes, ya que causa efectos adversos en el sistema nervioso central y presenta una alta absorción dérmica [14]. Para el diclofenaco, se han identificado varios productos de transformación y se conoce que se producen por diferentes mecanismos de oxidación y foto-oxidación [15-17] siendo el diclofenaco amida muy común en estas vías de transformación. Por último, el ketoprofeno tiene varios productos de transformación conocidos de los cuales el 3-acetobenzofenona (3-AcBP) es uno de los más importantes [18-20].

Aunque hay muchos estudios en la bibliografía sobre la presencia de los NSAIDs en muestras ambientales [5-8], a nuestro entender, la información disponible sobre la presencia de los productos de transformación de estos fármacos en este tipo de muestras es muy escasa. Como ejemplos de los estudios realizados, el 4-IBAP se ha detectado en muestras de aguas residuales obtenidas en plantas de tratamiento en Suecia en concentraciones entre los 8 y los 540 ng L<sup>-1</sup> [21-22] y el diclofenaco amida se ha detectado en muestras de aguas residuales y de agua de río en Pakistán a concentraciones de 30 a 400 ng L<sup>-1</sup> [17].

Las principales dificultades al estudiar los productos de transformación de los productos farmacéuticos en matrices ambientales están relacionadas con la complejidad de la matriz de las muestras, y las bajas concentraciones de relevancia ambiental a la que se encuentran (ng L<sup>-1</sup>, ng g<sup>-1</sup>), que pueden generar problemas en relación con la sensibilidad y/o selectividad analítica de los métodos de determinación. Por estas razones, la preparación de muestras es totalmente necesaria con el fin de obtener el enriquecimiento suficiente para alcanzar la

detección muy bajas concentraciones, así como de la limpieza de los extractos para evitar las posibles interferencias y una larga vida de la instrumentación analítica. Para muestras acuosas, en general, la extracción en fase sólida (SPE) es la técnica más común aplicada para la determinación de productos de transformación de NSAIDs [16-18]. Sin embargo, esta técnica posee algunas desventajas tales como el uso de altas cantidades de disolventes orgánicos, siendo necesario mucho tiempo para proporcionar un enriquecimiento, generalmente limitado, de los analitos de interés, que implican pasos previos para conseguir una preconcentración adicional previa a la medida analítica. Las muestras de suelos y lodos suelen ser liofilizadas y extraídas mediante extracción con líquidos presurizados (PLE), que requiere una limpieza adicional del extracto con SPE debido a su baja selectividad [23-25] que resulta en un procedimiento tedioso y complejo. La microextracción en fase líquida con membranas de fibra hueca (HF-LPME) es una técnica alternativa atractiva para la preparación de muestras medioambientales. Esta técnica sólo consume cantidades insignificantes de disolventes, evita la contaminación entre muestras (por el uso de trozos de membrana desechables), tiene un bajo coste y se ha demostrado que proporcionan una alta selectividad, una buena eficacia de limpieza de los extractos, y que presenta altos factores de enriquecimiento para los compuestos farmacéuticos y sus productos de degradación en muestras de agua y aguas residuales [5, 21, 26]. Una ventaja adicional es que la HF-LPME también es aplicable para la extracción directa de analitos a nivel de trazas en lodos sin tratar, así como digeridos, ahorrando grandes cantidades de tiempo y trabajo. Esto se ha demostrado en varias publicaciones [7-8, 27-28]. La microextracción en fase líquida con membranas de fibra hueca se puede aplicar en diferentes configuraciones dependiendo de la aplicación [29-30]. En la modalidad de dos fases, una fase aceptora orgánica líquida llena el interior (lumen) de una membrana polimérica microporosa y se inmoviliza en los poros de la membrana para extraer los analitos a partir de una fase acuosa donadora (muestra). Este modo se utiliza preferentemente para compuestos orgánicos neutros y/o más hidrofóbicos ( $\log K_{ow} \geq 3$ ).

El método HF-LPME en dos fases para la extracción de 4-IBAP en muestras de aguas residuales, ha sido desarrollado previamente [21]. En el presente trabajo se presenta el desarrollo y optimización de un nuevo método, que incluye también otros dos productos de transformación de NSAIDs hidrofóbicos (3-AcBP y diclofenaco amida), aplicando en un tiempo de extracción significativamente menor (180 minutos en comparación con 540 minutos en el estudio anterior). El método se aplicó con éxito para la determinación de los analitos de interés en muestras de aguas residuales, así como de lodos de aguas residuales.

### 2. Materiales y métodos

#### 2.1. Disoluciones, reactivos y muestras

Todos los reactivos y disolventes utilizados en este trabajo tenían la máxima pureza disponible. Diclofenaco amida (CAS: 15362-40-0) fue proporcionado por TRC Inc. (North York, Canadá); 4-isobutilacetofenona (4-IBAP, CAS: 38861-78-8), 3-acetobenzofenona (3-AcBP, CAS: 66067-44-5) y 4-butilacetofenona (CAS: 37920-25-5) usado como estándar interno (IS), fueron proporcionados por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). Isooctano, n-hexano, acetona y tolueno fueron suministrados por Scharlau Chemie (Barcelona, España). Fueron suministrados también por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania) los disolventes cloroformo, 1-octanol y 2-heptanona. Cloruro sódico, hidróxido sódico y ácido sulfúrico fueron proporcionados por Across Organics (Gheel, Bélgica). El agua ultrapura (18,2 M $\Omega$  cm) fue obtenida mediante un sistema de purificación Milli-Q Gradient suministrado por Millipore (Billerica, MA, Estados Unidos). El tipo de membrana de fibra hueca utilizada para contener la fase orgánica aceptora fue una membrana tipo Accurel Q3/2 suministrada por Membrana (Wuppertal, Alemania), con un diámetro interno de 600  $\mu$ m, 200  $\mu$ m de grosor en la pared de la membrana y 0,2  $\mu$ m de tamaño de poro, para una porosidad habitual del 70%.

Las disoluciones madre de 4-IBAP, 3-AcBP y el estándar interno fueron preparadas disolviendo los reactivos patrón en hexano a 1000 mg L<sup>-1</sup> y la correspondiente al diclofenaco amida fue preparada en cloroformo a 245 mg L<sup>-1</sup>. Todas las disoluciones madre fueron almacenadas en un congelador ( $\approx$ -20°C). Las disoluciones de trabajo para la calibración fueron preparadas semanalmente mediante las correspondientes diluciones de las disoluciones madre en n-hexano. Las disoluciones necesarias para el fortificado de las muestras se prepararon semanalmente por dilución de las correspondientes disoluciones madre en una mezcla hexano-acetona (1:50) y fueron almacenadas en un frigorífico y en la oscuridad ( $\approx$ 6°C) hasta su análisis.

Las muestras de agua influente (a la entrada de la planta) fueron recogidas antes del cribado inicial en cinco plantas de tratamiento de aguas residuales en el sur de Suecia: Sjölanda , Klagshamn , Kallby , Kävlinge y Ellinge durante el mes de junio de 2013. Las plantas de Klagshamn y Sjölanda están situadas en la ciudad de Malmö, la tercera ciudad más grande de Suecia. Sjölanda recibe las aguas residuales de aproximadamente 420.000 habitantes-equivalentes [36] (PE, population equivalent, que se define como la cantidad de agua que tiene una carga orgánica

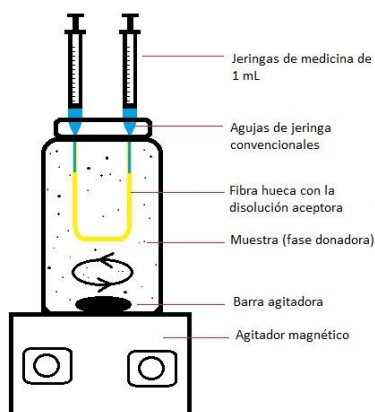
biodegradable con una demanda bioquímica de oxígeno de cinco días ( $DBO_5$ ) equivalente a 60 gramos de oxígeno por día) de Malmö, así como de las ciudades cercanas. Klagshamn recibe las aguas residuales de aproximadamente 60.000 PE de Malmö y la cercana ciudad de Vellinge. La planta de Källby se encuentra en la ciudad de Lund y trata las aguas residuales de aproximadamente 80.000 PE de Lund, así como los pueblos de los alrededores. La planta de tratamiento de Kävlinge está situada en la localidad de Kävlinge y recibe las aguas residuales de aproximadamente 30.000 PE. Por último, la planta de Ellinge sirve a la comunidad de Eslöv y a la planta de producción de alimentos Procordia Foods. Dependiendo de la temporada, la carga varía de aproximadamente 25.000 PE a 100.000 PE. En Ellinge, se recogieron muestras de agua influente, así como del efluente del tratamiento de lodos activados convencional (CAS) y de lodo digerido obtenido en el sistema de centrifuga que proporciona la deshidratación del lodo final. Las muestras se recolectaron en botellas de vidrio (aguas residuales) y botes de plástico (lodos), que se transportaron al laboratorio, y se mantuvieron aproximadamente a 4°C en la oscuridad hasta su análisis.

Las muestras de lodos se pre-trataron de acuerdo con el método desarrollado por Sagristà y colaboradores [7]. Brevemente, alícuotas de 2 g (en peso húmedo) de lodo digerido homogeneizado se mezclaron con 100 mL de agua Milli-Q y se agitaron durante 18 horas a 660 rpm para llegar a la partición de equilibrio de los analitos entre la fase sólida (muestra) y la fase acuosa. Después, las muestras de lodo al igual que las de aguas residuales se sometieron al procedimiento de extracción HF-LPME en la modalidad de dos fases que se describe a continuación.

### **2.2. Procedimiento de extracción**

El montaje de microextracción en fase líquida diseñado para la extracción de los productos de transformación de NSAIDs se muestra en la Figura 27. Antes de la extracción, las fibras huecas se cortaron en piezas de 6 cm y se limpiaron con acetona para eliminar cualquier posible contaminante, después de lo cual, la acetona se dejó evaporar al aire completamente. Para llevar a cabo la extracción, un extremo de la fibra se une a una aguja de jeringa médica (100 Sterican, diámetro interior de 0,7 mm y 50 mm de longitud, proporcionadas por Laboratorio Scantec AB, Gothenburg, Suecia). Se encontró que estas agujas permiten una unión rápida y completa a la membrana. Con una jeringa médica de 1 ml, se pasó el disolvente extractante a través de la fibra para asegurar que el lumen de la membrana quede

completamente lleno con la fase orgánica aceptora. Entonces, el otro extremo de la fibra se unió a otra aguja de jeringa médica conformando el montaje en forma de U. Después de eso, los poros de la fibra se impregnaron con el disolvente orgánico durante 60 segundos y el montaje se sumergió en agua Milli-Q durante unos segundos para eliminar el exceso de disolvente orgánico en la superficie de la membrana. La fibra en forma de U se coloca en la muestra acuosa (100 mL) para la extracción. Una vez transcurrido el tiempo de extracción, el montaje se retira de la disolución donadora y se seca cuidadosamente la superficie exterior de la membrana con un trozo de papel para evitar trazas de agua en el extracto orgánico. La fase aceptora se recogió en un vial de 1,5 mL con un inserto de 250  $\mu\text{L}$  de volumen en su interior. Se toma un extremo de la membrana y mediante una jeringa de 10 mL se empuja el extracto con aire a través de la fibra para sacar el extracto por el otro extremo al vial. Posteriormente, se transfirió un total de 5  $\mu\text{L}$  de extracto orgánico a otro vial de cromatografía de gases conteniendo 45  $\mu\text{L}$  de hexano y el patrón interno a 10  $\mu\text{L L}^{-1}$ . Finalmente, se inyectó un volumen de 2  $\mu\text{L}$  de esta disolución en el sistema GC-MS.



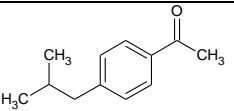
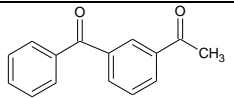
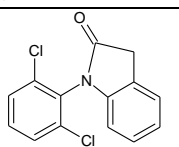
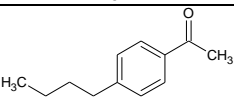
**Figura 27.** Esquema de la disposición de la membrana para la extracción de productos de degradación de NSAIDs en la modalidad de dos fases.

### 2.3. Optimización de la separación cromatográfica y detección de masas

Los extractos se analizaron mediante un cromatógrafo de gases de la serie 45X equipado con un inyector automático CP-8400, un inyector de split/splitless y un detector de masas con triple cuadrupolo Scion-TQ (Bruker Corporation, Fremont, CA,

Estados Unidos). Los analitos se separaron usando una columna Factor Four Vf-1MS, completamente apolar (100% dimetilpolisiloxano) suministrada por Varian (Darmstadt, Alemania), con una longitud de 30 metros, un diámetro interno de 0,32 mm y con un espesor de fase estacionaria de 0,25 micras. Se utilizó como gas portador helio (Strandmøllen, Klampenborg, Dinamarca) que se mantuvo a una velocidad de flujo constante de 1,5 mL min<sup>-1</sup>. El programa cromatográfico consta de un mantenimiento a 60°C durante 2 minutos, un aumento de temperatura a 10°C min<sup>-1</sup> hasta 130°C, con un mantenimiento de 1 minuto y una última rampa de temperatura a una velocidad de 40 °C min<sup>-1</sup> hasta 280°C con un mantenimiento final de 3 minutos. El tiempo total del cromatograma fue de 18 minutos. Se inyectó un volumen de 2 µL en el modo sin división (tiempo de inyección sin división: 2 minutos). La temperatura para la línea transferencia y para el inyector fue establecida en 280°C y en para la fuente de iones del detector en 230°C. La ionización de los analitos se realizó en el espectrómetro de masas mediante impacto de electrones (EI) (70 eV). El análisis se realizó en el modo de seguimiento de iones seleccionados (SIM) usando los iones característicos para los analitos indicados en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Propiedades e iones característicos de los analitos.

Analito	Estructura química	Masa molecular	Log K <sub>ow</sub> <sup>†</sup>	Ion para cuantificación (m/z)	Ion para confirmación (m/z)
4-isobutilacetofenona		176,24	3,54 ± 0,23	161	176
3-acetobenzofenona		224,25	3,02 ± 0,33	105	209
Diclofenaco amida		278,13	3,00 ± 0,37	214	242
4-butilacetofenona (Estándar Interno)		176,25	3,72 ± 0,22	161	176

<sup>†</sup>Valores calculados usando el programa informático: ACDLabs 12.0, Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, Canadá.

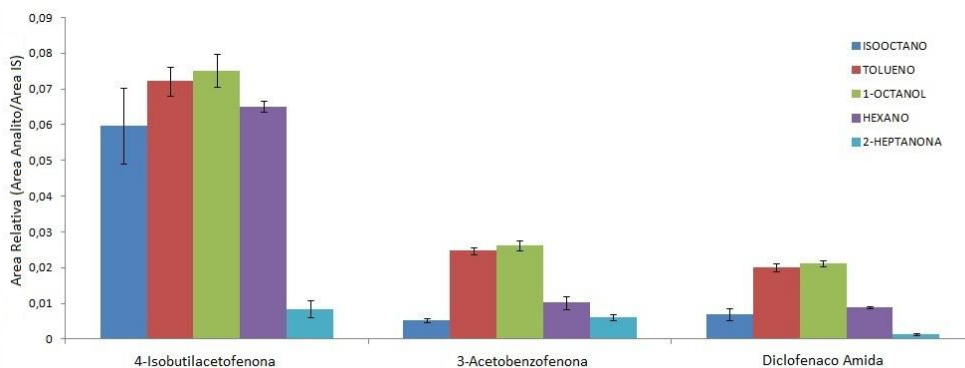
### 3. *Discusión y resultados*

#### 3.1. *Optimización de la microextracción en fase líquida*

Los analitos de interés son compuestos hidrofóbicos y no cargados y, por tanto, fácilmente extraíbles de una muestra acuosa en un disolvente orgánico. Para este tipo de compuestos resulta más adecuado utilizar un sistema de extracción con membrana líquida en la modalidad de dos fases. Para determinar las condiciones de la HF-LPME más favorables para el análisis de las muestras se realizó una optimización univariante, fijando los valores iniciales de las variables en: 8 cm de longitud de la membrana, tolueno como disolvente extractante, 400 rpm como velocidad de agitación de la muestra, temperatura ambiente ( $\approx 25^{\circ}\text{C}$ ), sin ajuste del pH de la muestra y sin adición de sal para el ajuste de la fuerza iónica. Los experimentos de optimización se realizaron en agua Milli-Q y en agua residual libre de los analitos de interés que fue fortificada a una concentración de  $1\ \mu\text{g L}^{-1}$  de cada analito. Todos los resultados se expresaron como valores medios de tres replicados.

##### 3.1.1. *Optimización del tipo de disolvente*

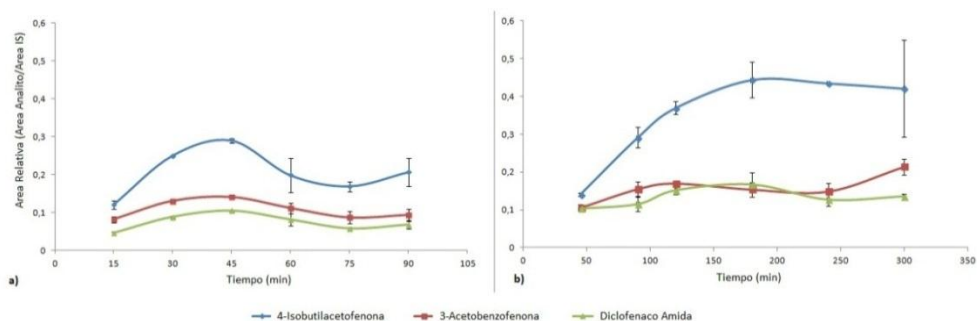
El tipo de disolvente orgánico en la fibra hueca es importante para lograr una alta eficiencia de extracción. Hay varios requisitos para la selección de la fase orgánica: El disolvente orgánico debe quedar totalmente inmovilizado en los poros de la membrana, por lo que debe ser inmisible con el agua y no volátil para evitar la pérdida de disolvente durante la extracción. Además, la fase aceptora debe ser selectiva con respecto a los analitos de interés. Sobre la base de estas consideraciones, cinco disolventes orgánicos se ensayaron para extraer los analitos (hexano, isooctano, tolueno, 1-octanol y 2-heptanona) en agua Milli-Q y agua residual. Como puede verse en la Figura. 28, Tolueno y 1-octanol dieron los mejores resultados, pero los experimentos mostraron que el tolueno presenta mayor tendencia a abandonar la fibra durante la extracción que el 1-octanol. En consecuencia, el 1-octanol fue elegido como fase aceptora para realizar la extracción tanto en agua Milli-Q como en agua residual.



**Figura 28.** Efecto del tipo de disolvente en el área relativa de los analitos. El área relativa se obtiene como: área del pico del analito/área de pico del estándar interno (4-BAP).

### 3.1.2. Optimización del tiempo de extracción

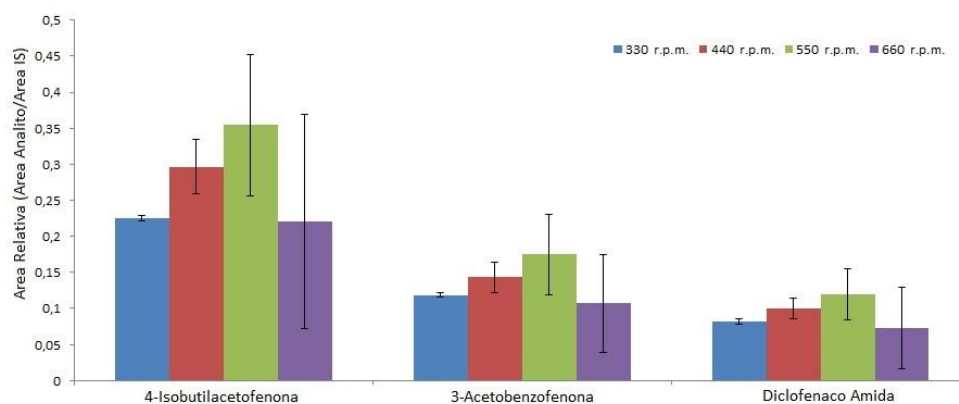
Se espera que la concentración de los analitos transferidos de la fase de donadora al disolvente orgánico aumente con el aumento del tiempo de exposición en la muestra y que alcance el máximo nivel en el estado de equilibrio. El efecto del tiempo de extracción sobre la eficacia de la extracción se evaluó de 15 a 90 minutos en agua Milli-Q fortificada con los tres analitos. El área de pico relativa de los analitos aumentó durante los primeros 45 minutos y se produjo una disminución para tiempos de extracción más largos. La razón de la disminución de la eficiencia de la extracción y también los mayores valores de la desviación estándar relativa (%RSD) puede ser la pérdida del disolvente orgánico de la membrana. Sin embargo, la transferencia de masa de la fase de acuosa donadora a la fase aceptora orgánica se ve afectada por la matriz de la muestra de modo que el tiempo de extracción también se evaluó de 45 minutos a 300 minutos en agua residual fortificada. La Figura 29 muestra que 180 minutos es el valor óptimo para el tiempo de extracción teniendo en cuenta el efecto de la matriz de la muestra, por lo tanto, este tiempo se seleccionó para los experimentos posteriores.



**Figura 29.** Efecto del tiempo de extracción en el área de pico relativa (área del pico del analito/área de pico del estándar interno (4-BAP)) de los analitos en (a) agua Milli-Q y (b) agua residual. Las barras de error indican la desviación estándar relativa ( $n = 3$ ).

### 3.1.3. Optimización de la velocidad de agitación

La agitación de la muestra puede acelerar la transferencia de masa de los analitos extraídos de la muestra al disolvente orgánico y reducir el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio. Para estimar la influencia de la velocidad de agitación, se estudiaron cuatro velocidades de agitación de 330 rpm a 660 rpm. Como se puede ver en la Figura 30, el área relativa de los picos de los analitos aumento con el incremento de la velocidad de agitación a 550 rpm, mientras que por encima de este valor se observó una disminución, posiblemente debida a la pérdida de disolvente orgánico de la membrana. Por otro lado, cuando la velocidad de agitación se fijó a 550 rpm, los valores de la desviación estándar relativa eran demasiado altos, así que se tomó una situación de compromiso y 440 rpm fue seleccionada como la velocidad de agitación para realizar la extracción en los siguientes experimentos. En este caso no se observaron diferencias entre los valores óptimos en agua Milli-Q y en agua residual.



**Figura 30.** Efecto de la velocidad de agitación en el área de pico relativa (área del pico del analito/área de pico del estándar interno (4-BAP)) de los analitos. Las barras de error indican la desviación estándar relativa ( $n = 3$ ).

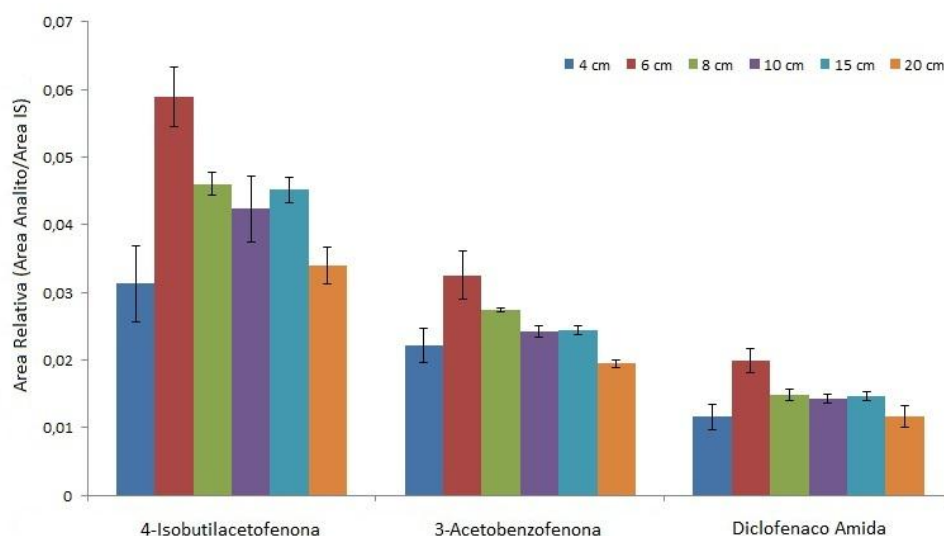
### 3.1.4. Optimización de la longitud de la membrana de fibra hueca

La longitud de la fibra está directamente relacionada con el volumen de la fase aceptora que contiene y, por tanto, con la eficacia de la extracción. El efecto del volumen de disolvente orgánico se estudió con valores de longitud de la membrana de 4 a 20 cm. Un centímetro de membrana de fibra hueca Q3/2 con una porosidad aproximada del 70% puede contener aproximadamente 8  $\mu\text{L}$  de disolvente orgánico en función de la densidad y la viscosidad de la fase aceptora. La Figura 31 muestra que 6 cm de longitud de fibra ofrece los mejores resultados para la extracción de los analitos. Por lo tanto, este valor de longitud fue elegido para los siguientes experimentos.

### 3.1.5. Optimización del ajuste de la fuerza iónica

La adición de sal a la muestra puede tener diferentes efectos. En primer lugar, la adición de sal puede reducir la cantidad de agua disponible para disolver los analitos debido a la formación de esferas de hidratación alrededor de los iones de la

sal y puede mejorar la eficiencia de la extracción de los analitos en la fase orgánica. Por otro lado, la adición de sal puede conducir a una mayor fuerza iónica en la muestra (efecto "salting out ") que puede mejorar la eficiencia de la extracción debido a cambios en las propiedades físicas de la muestra. Se estudiaron diferentes cantidades de sal (NaCl) de 0% a 15% y se observó que las áreas relativas disminuyeron con el aumento de la concentración de sal en agua Milli-Q. Sin embargo, las mismas cantidades de sal en el agua residual enriquecida no tenían ningún efecto sobre la eficacia de la extracción y los experimentos mostraron que la sal evita la pérdida del disolvente de la membrana. Por lo tanto, para los experimentos posteriores se añadió un 5% de sal a las muestras para realizar la extracción.



**Figura 31.** Efecto de la longitud de la membrana en el área de pico relativa (área del pico del analito/área de pico del estándar interno (4-BAP)) de los analitos. Las barras de error indican la desviación estándar relativa (n = 3).

### 3.1.6. Optimización de la temperatura y el pH de la muestra

La temperatura tiene un efecto significativo en la cinética y la termodinámica del proceso de extracción. Los coeficientes de transferencia de masa y constantes de velocidad mejoran, generalmente, al aumentar la temperatura, y como resultado, un

aumento de la temperatura de la muestra puede mejorar la eficiencia de la extracción. Los efectos de la temperatura se estudiaron de 25 a 50°C, pero las áreas relativas de los picos de los analitos no se vieron afectadas por este aumento, por lo que los análisis posteriores se realizaron a temperatura ambiente ( $\approx 25^\circ\text{C}$ ).

Teniendo en cuenta la estructura y propiedades químicas de los analitos se espera que el pH no afecte a la eficacia de la extracción significativamente. El pH estudiado varió de 2 a 9 unidades de pH. Como era de esperar no se observó ningún efecto del pH de la muestra en la eficacia de la extracción. Por lo tanto, no se realizó ningún ajuste del pH de las muestras para llevar a cabo la extracción.

### 3.2. Validación del método

Con el fin de evaluar la aplicabilidad práctica del método propuesto, se estudiaron, en muestras de agua residual que no contenían los analitos: el factor de enriquecimiento ( $E_f$ ), el intervalo de linealidad, el límite de detección (LOD), el límite de cuantificación (LOQ), la repetitividad y la reproducibilidad. Los resultados se muestran en la Tabla 13. En los métodos de microextracción en fase líquida, en la modalidad de dos fases, el factor de enriquecimiento se utiliza para evaluar la eficacia del procedimiento de extracción [Ecuación (19)]. Este parámetro se define como la relación de la concentración de analito en la fase aceptora orgánica ( $C_o$ ) después de la extracción dividido por la concentración inicial en la muestra acuosa (fase donadora) antes de la extracción ( $C_d$ ). En este caso, el volumen de la fase acuosa donadora es  $V_d = 100 \text{ mL}$  y el volumen de la fase orgánica aceptora es  $V_o = 5 \mu\text{L}$  de 1-octanol.

La linealidad del método se evaluó sobre el intervalo de concentración de 10 a 500  $\text{ng L}^{-1}$ . En general, la linealidad se cumplió a lo largo de todo el rango evaluado con unos coeficientes de regresión ( $R^2$ ) que oscilan entre 0.9968 y 0.9997. Los límites de detección y cuantificación se calcularon con los datos generados en los estudios de linealidad. Los límites de detección y de cuantificación se calcularon como la concentración de analito que corresponde a una señal igual a " $a + 3 S_{y/x}$ " y " $a + 10 S_{y/x}$ ", respectivamente, donde " $a$ " es la ordenada en el origen, y " $S_{y/x}$ " indica los errores aleatorios en los valores de la pendiente. Los valores oscilan desde 10,5 hasta 41,1  $\text{ng L}^{-1}$  para el LOD y desde 35,0 a 137,1  $\text{ng L}^{-1}$  para el LOQ.

La repetitividad se estudió mediante el análisis de tres muestras de aguas residuales y agua Milli-Q en el mismo día enriquecidas hasta 1  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Los valores de la desviación estándar relativa (%RSD) fueron inferiores a 10,3% en agua Milli-Q y del

15,6% en el agua residual. La reproducibilidad se estudió en varios días mediante el análisis de seis muestras de agua residual y agua Milli-Q con una concentración final de los analitos de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ . Los valores de la RSD (%) para los analitos en este caso fueron inferiores a 12,2% y del 16,1%, respectivamente.

**Tabla 13.** Parámetros analíticos del método HF-LPME optimizado.

Analito	$E_f$	$R^2$	LOD ( $\text{ng L}^{-1}$ )	LOQ ( $\text{ng L}^{-1}$ )	Repetitividad (%) <sup>a,b</sup>		Reproducibilidad (%) <sup>a,c</sup>	
					Agua Milli-Q	Agua residual	Agua Milli-Q	Agua residual
4-isobutilacetofenona	965	0,9997	10,5	35,0	4,7	8,0	7,2	9,0
3-acetobenzofenona	519	0,9981	18,6	62,1	10,3	12,4	12,2	14,9
Diclofenaco amida	315	0,9968	41,1	137,1	3,4	15,6	9,5	16,1

<sup>a</sup> concentración  $1 \mu\text{g L}^{-1}$

<sup>b</sup> n=3

<sup>c</sup> n=6

### 3.3. Aplicación a muestras reales

El método de microextracción en fase líquida en la modalidad de dos fases desarrollado en este trabajo se aplicó para la determinación de los analitos de interés en agua residual de cinco plantas depuradoras en el sur de Suecia. Los resultados se muestran en la Tabla 14. De acuerdo con estos resultados, el 3-acetobenzofenona fue el compuesto que se detectó con más frecuencia, encontrándose en concentraciones mayores al límite de detección el afluente de cuatro de las cinco plantas estudiadas. La vía principal de productos farmacéuticos en las aguas residuales es la excreción humana a través de la orina y las heces después del consumo. El 3-acetobenzofenona no es el principal metabolito humano del ketoprofeno aunque se ha demostrado que se forma en ratas en cantidades muy bajas, correspondientes a aproximadamente el 0,03% de la dosis administrada de ketoprofeno [31]. Sin embargo, se ha identificado como un producto fototransformación importante de ketoprofeno, formado incluso después de una exposición muy breve a la luz ultravioleta [18]. En un estudio realizado por Falås y colaboradores, se demostró que el ketoprofeno se encontraba en concentraciones medias mayores a  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  en influentes de 162 plantas de aguas residuales de Suecia [32]. Hay, pues, posibilidad de que los procesos fototransformación tengan lugar. Sin embargo, en nuestro estudio, en todos los casos, la toma de muestras se llevó a cabo directamente del agua influente después de llegar a las plantas y el transporte del agua residual desde su origen a la planta se realiza por canalizaciones bajo tierra, lo que significa que la exposición a la luz ha sido insignificante. Por consiguiente, consideramos que sea más probable que el 3-acetobenzofenona

encontrado en los influentes es el resultado del metabolismo humano. Las concentraciones detectadas en nuestro estudio son aproximadamente de  $60 \text{ ng L}^{-1}$ , que corresponde a alrededor el 0,06 % de la media de la concentración de ketoprofeno que se encuentra en los influentes de las plantas de tratamiento. El producto de transformación del ibuprofeno, 4-isobutilacetofenona (4-IBAP), se encontró a la concentración mayor de todos los analitos ( $197 \text{ ng L}^{-1}$ ) en el afluente a la planta de Sjölanda, aunque fue no detectado o por debajo de límite de cuantificación en las otras cuatro plantas depuradoras. Estudios previos muestran un patrón similar. En 2007, Zorita y colaboradores [21] sólo detectan 4-IBAP en dos de las cuatro muestras tomadas de diferentes partes de la red de alcantarillado de la ciudad de Kristianstad, en el sur de Suecia, en concentraciones más bajas a la hallada en nuestro estudio ( $26,5$  y  $39,7 \text{ ng L}^{-1}$ , respectivamente). En un nuevo estudio publicado en 2009, el compuesto se detectó en el afluente a la planta de Kristianstad en tres de cinco tomas de muestra en concentraciones significativamente más elevadas ( $320$ - $540 \text{ ng L}^{-1}$ ) [22]. La presencia de este compuesto muestra, por lo tanto, un patrón intermitente. Al igual que el 3-acetobenzofenona, el 4-IBAF es un producto de fototransformación y no un producto resultante del metabolito humano. No obstante, a menudo se encuentra en pequeñas cantidades en las preparaciones de ibuprofeno, lo que podría ser la razón de su presencia en las aguas residuales analizadas [22]. Finalmente, el diclofenaco amida sólo se detectó a una concentración mayor al límite de detección en la planta depuradora de Ellinge. No se observa una tendencia clara entre las plantas estudiadas, a excepción del hecho de que ninguno de los analitos se detectó en el afluente a la planta de Källby. Es difícil encontrar una explicación satisfactoria para esta observación ya que el sistema de alcantarillado de la ciudad de Lund no difiere en principio de las otras ciudades y nos resulta muy poco probable que el consumo de los NSAIDs sea significativamente menor en Lund que sus ciudades vecinas. Por tanto, dada la intermitencia general observada para la presencia de estos analitos en las aguas residuales, atribuimos la ausencia de los analitos en el afluente de la planta de Källby a dicha detección intermitente. Este comportamiento a su vez, es más probable, debido a que estos compuestos no son metabolitos principales de los procesos bioquímicos humanos, aunque están presentes en el agua, ya sea por su aparición como contaminantes en las preparaciones consumidas de los NSAIDs o por su formación en los potenciales procesos de transformación microbiana en el sistema de tratamiento de aguas residuales, que podrían ser altamente dependientes de las condiciones bióticas y abióticas, cambiando de día a día o de estación en estación.

Estos resultados muestran que las cantidades no detectables o muy bajas de estos compuestos llegan a las plantas depuradoras por los desagües, lo que implica que, probablemente, representen una preocupación menor por su efecto en el medio ambiente. Sin embargo, los estudios han revelado que los NSAIDs sufren una transformación biológica sustancial dentro de las plantas [33-34]. Otros trabajos anteriores han demostrado, por ejemplo, la transformación de diclofenaco en diclofenaco amida durante el proceso de formación del lodo activado [35]. Debido a la hidrofobicidad de los analitos investigados también podrían tener una potencial capacidad de acumulación en el lodo, que proporcionaría otra vía para su distribución en el medio ambiente a través de la utilización de lodos como fertilizante en agricultura. Para investigar esto, se tomaron muestras del agua que entra (bio-influyente) y del agua que sale (bio-efluente) del tratamiento de lodos activados, así como muestras de mezcla de lodos activados deshidratados y lodos digeridos, de la depuradora de Ellinge. En esta ocasión, se detectó únicamente diclofenaco amida. Como puede verse en la Tabla 15, la concentración aumentó durante el tratamiento de lodos activados encontrándose a  $132 \text{ ng L}^{-1}$  en el efluente secundario, lo que implica una formación de este compuesto durante el tratamiento. En el lodo digerido, también se detectó sólo este compuesto a una concentración de  $183 \text{ ng g}^{-1}$ , que demuestra su potencial para acumularse en el lodo y así pasar al medio ambiente.

**Tabla 14.** Concentración de los productos de degradación de NSAIDs estudiados en agua influyente de plantas de tratamiento de aguas residuales en el sur de Suecia.

Analito	Concentración ( $\text{ng L}^{-1}$ )				
	SJÖLUNDA	KÄLLBY	ELLINGE	KLAGSHAMN	KÄVLIMGE
4-isobutilacetofenona	$196,7 \pm 10,7$	n.d.	n.d.	< LOQ (6,3)	< LOQ (1,3)
3-acetobenzofenona	$55,4 \pm 12,9$	n.d.	$88,8 \pm 23,2$	$46,6 \pm 13,0$	$57,5 \pm 18,8$
Diclofenaco amida	n.d.	n.d.	$54,5 \pm 20,2$	< LOQ (27,5)	< LOQ (25,1)

**Tabla 15.** Concentración de diclofenaco amida en agua bio-influyente, bio-efluente y lodos de la planta de aguas residuales de Ellinge.

Analito	Concentración ( $\text{ng L}^{-1}$ )		Concentración ( $\text{ng g}^{-1}$ )
	Bio-influyente	Bio-efluente	Lodo
Diclofenaco amida	$108,8 \pm 10,0$	$131,6 \pm 5,5$	$182,8 \pm 6,2$

### 4. Conclusiones

En este trabajo, se ha desarrollado y validado un método de microextracción en fase líquida en la modalidad de dos fases para la extracción directa de tres productos de transformación hidrofóbicos de NSAIDs en aguas residuales y lodos. El análisis de agua influente de cinco plantas depuradoras suecas reveló la presencia de estos compuestos en la mayoría de las muestras, aunque en cantidades muy bajas. Por tanto, puede concluirse que la entrada de estos compuestos en las plantas de tratamiento es de menor interés. Sin embargo, el análisis de agua en el tratamiento de lodos activados y lodos digeridos mostró que al menos uno de los analitos, diclofenaco amida, puede formarse durante el tratamiento de aguas residuales y acumularse en los lodos. De este modo, como conclusión final, no puede descartarse, por completo, una liberación ambiental significativa de estos compuestos a través de las plantas de tratamiento de aguas residuales. Este hecho debe promover la realización de otros estudios sobre la formación de estos compuestos y su reparto en los lodos obtenidos en las plantas depuradoras de aguas residuales para la evaluación de su posible distribución y daño al medio ambiente.

### **Referencias**

- [1] Nikolaou, A., *Global Nest Journal*, 15 (2013) 1-12.
- [2] Ortiz de García, S., Pinto Pinto, G., García Encina, P., Irusta Mata, R., *Sci. Total Environ.*, 444 (2013) 451-465.
- [3] Yu, Y., Wu, L., *Talanta*, 89 (2012) 258-263.
- [4] Gilart, N., Marcé, R. M., Fontanals, N., Borrull, F., *Talanta*, 110 (2013) 196-201.
- [5] Villar Navarro, M., Ramos Payan, M., Fernández-Torres, R., Bello-López, M. A., Callejón M., Guiráum- Pérez, M. A., *Electrophoresis*, 32 (2011) 2107-2113.
- [6] Olives, A. I., González-Ruiz, V., Martín, M. A., *Anti-Inflamm. Anti-Allergy Agents Med. Chem.*, 11 (2012) 65-95.
- [7] Sagristà, E., Larsson, E., Ezoddin, M., Hidalgo, M., Salvadó, V., Jönsson, J. Å., *J. Chromatogr. A.*, 1217 (2010) 6153-6158.
- [8] Larsson, E., Rabayah, A., Jönsson J. Å., *J. Environ. Prot.*, 4 (2013) 946-955
- [9] Fatta-Kassinos, D., Vasquez, M. I., Kümmerer, K., *Chemosphere*, 85 (2011) 693-709.
- [10] Kosjek, T., Heath, E., *Trends Anal. Chem.*, 27 (2008) 807-820.
- [11] Szabó, R. K., Megyeri, C., Illés, E., Gajda-Schranz, K., Mazellier, P., Dombi, A., *Chemosphere*, 84 (2011) 1658-1663.
- [12] Madhavan, J., Grieser, F., Ashokkumar, M., *J. Hazard. Mater.*, 178 (2010) 202-208.
- [13] Caviglioli, G., Valeria, P., Brunella, P., Sergio, C., Attilia, A., Gaetano, B., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 30 (2002) 499-509.
- [14] Ruggeri, G., Ghigo, G., Maurino, V., Minero, C., Vione, D., *Water. Res.*, 47 (2013) 6109-6121.
- [15] Minetto, L., Mayer, F.M., Mallmann, C. A., Martins, A. F., *Clean-Soil, Air, Water*, 40 (2012) 950-957.
- [16] Eriksson, J., Svanfelt, J., Kronberg, L., *J. Photochem. Photobiol.*, 86 (2010) 528-532.
- [17] Scheurell, M., Franke, S., Shah, R. M., Hühnerfuss, H., *Chemosphere*, 77 (2009) 870-876.
- [18] Kosjek, T., Perko, S., Heath, E., Kralj, B., Zigon, D., *J. Mass Spectrom.*, 46 (2011) 391-401.
- [19] Nakajima, A., Tahara, M., Yoshimura, Y., Nakazawa, H., *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 174 (2005) 89-97.
- [20] Dvořák, J., Hájková, R., Matysová, L., Nováková, L., Koupparis, M.A., Solich, P., *J. Pharm. and Biomed. Anal.*, 36 (2004) 625-629.
- [21] Zorita, S., Barri, T., Mathiasson, L., *J. Chromatogr. A*, 1157 (2007) 30-37.
- [22] Zorita, S., Mårtensson, L., Mathiasson, L., 407 (2009) *Sci. Total Environ.*, 2760-2770.
- [23] Martín, J., Camacho-Muñoz, D., Santos J. L., Aparicio, I., Alonso, E., *J. Hazard. Mater.*, 239 (2012) 40-47.

- [24] Jelic´, A., Gros, M., Ginebreda, A., Cespedes-Sánchez, R., Venturad, F., Petrovic´ M., Barceló, D., *Water. Res.*, 45 (2011) 1165-1176.
- [25] Jelic, A., Petrovic´, M., Barceló, D., *Talanta*, 80 (2009) 363-371.
- [26] Es’haghi, Z., *Anal. Chim. Acta*, 641 (2009) 83-88.
- [27] Sagristà, E., Cortés, J. M., Larsson, E., Hidalgo, M., Salvadó, V., Jönsson, J. Å., *J. Sep. Sci.*, 35 (2012) 2460-2468.
- [28] Vasskog T., Bergersen O., Anderssen T., Jensen E., Eggen, T., *Waste Manage.*, 28 (2009) 2808-2815.
- [29] Jönsson, J. Å., “Comprehensive Sampling and Sample Preparation, Volume 2”, Pawliszyn, J., Lord, H. L. (ed.), Elsevier, Academic Press (2012) Oxford, UK, 461-474.
- [30] Bello-López, M. A., Ramos-Payán, M., Ocaña-González, J. A., Fernández-Torres, R., Callejón-Mochón, M., *Anal. Letters*, 45 (2012) 804-830.
- [31] Komuro, M., Higuchi, T., Hirobe, M., *Bioorg. Med. Chem.*, 3 (1995) 55-65.
- [32] Falås, P., Andersen H. R., Ledin A., la Cour Jansen, J., *Water Sci. Technol.*, 66 (2012) 783-791.
- [33] Ferrando-Climent, L., Collado, N., Buttiglieri, G., Gros, M., Rodriguez-Roda, I., Rodriguez-Mozaz, S., Barceló, D., *Sci. Total Environ.*, 438 (2012) 404-413.
- [34] Lahti, M., Oikari A., *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 61 (2011) 202-210.
- [35] Kosjek T., Heath E., Kompare, B., *Anal. Bioanal. Chem.*, 387 (2007) 1379-1387.
- [36] Directiva 91/271/CEE, del Consejo del 21 de mayo, sobre el tratamiento de las aguas residuales.  
[http://europa.eu/legislation\\_summaries/environment/water\\_protection\\_management/l28008\\_es.htm](http://europa.eu/legislation_summaries/environment/water_protection_management/l28008_es.htm)

### **Anexo 2:**

\*Manuscript

[Click here to view linked References](#)

1           2     **Determination of 4'-isobutylacetophenone and other transformation products of**  
2           2     **nonsteroidal anti-inflammatory drugs in water and sludge from five wastewater**  
3           3     **treatment plants in Sweden**  
4           4  
5           5     Jose Manso<sup>a</sup>, Estelle Larsson<sup>b\*</sup>, Jan Åke Jönsson<sup>b</sup>  
6           6     <sup>a</sup>Departamento de Química y Ciencia de los Materiales, Facultad de Ciencias  
7           7     Experimentales, Universidad de Huelva, Campus de El Carmen, P.O. Box 21007  
8           8     Huelva, Spain  
9           9     <sup>b</sup>Centre for Analysis and Synthesis, Lund University, P.O. Box 124, 221 00 Lund,  
10          10     Sweden  
11          11     corresponding author\* estelle.larsson@organic.lu.se  
12  
13          13     **Abstract**  
14          14     This work describes the development of a two-phase hollow fiber liquid phase  
15          15     microextraction method for the determination of three hydrophobic transformation  
16          16     products of the nonsteroidal anti-inflammatory drugs ketoprofen, ibuprofen and  
17          17     diclofenac: 3-acetobenzophenone, 4'-isobutylacetophenone and diclofenac amide.  
18          18     The optimized method involved extraction for 180 min at a stirring speed of 440 rpm.  
19          19     Hollow fibers (0.6 mm i.d.) of 6 cm length were employed and the acceptor phase  
20          20     consisted of 1-octanol. Addition of 5 % sodium chloride to samples was performed to  
21          21     prevent loss of the solvent during extraction. Extracts were analyzed by GC-MS and  
22          22     method detection limits were in the range 10.5 - 41.1 ng L<sup>-1</sup>. The method was applied  
23          23     for the determination of target analytes in influent samples from five Swedish  
24          24     wastewater treatment plants (WWTPs). All three analytes were found in very low or  
25          25     non-detectable concentrations. The most abundant compound was 3-  
26          26     acetobenzophenone found at four of the investigated WWTPs at an average  
27          27     concentration of 62 ng L<sup>-1</sup>. Diclofenac amide and 4'-isobutylacetophenone were only  
28          28     detected above LOD at one WWTP each at a concentration of 55 and 197 ng L<sup>-1</sup>,  
29          29     respectively. Samples of water entering and exiting the activated sludge treatment as  
30          30     well as digested sludge were also collected from one of the WWTPs. Only diclofenac  
31          31     amide was detected in these samples. A higher concentration was detected in the  
32          32     effluent from the activated sludge treatment than the influent, thus indicating the  
33          33     formation of this compound during treatment. In the sludge, diclofenac amide was  
34          34     detected at 129 ng g<sup>-1</sup>wet weight. Based on these results it can be concluded that the

1

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

amounts of these compounds reaching WWTPs are very small, suggesting negligible risks to the aquatic environment. However, they also indicate the potential formation during the activated sludge process and accumulation into sludge for at least one of the compounds why further studies of these processes are needed.

### **Keywords**

*4-IBAP, diclofenac amide, 3-acetobenzophenone, 3-AcBP, ketoprofen impurity A, pharmaceuticals, transformation products, wastewater, sludge*

### **1. Introduction.**

A wide number of pharmaceutical compounds and their metabolites are introduced into the environment each year, threatening the health of aquatic and terrestrial ecosystems. In recent years, interest regarding the occurrence and toxicity of these compounds has grown considerably [1-4]. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) belong to the most studied pharmaceuticals and their occurrence in the environment has attracted great interest among researchers [5-8]. Today we are aware of their presence, toxicity and damage to the environment. However, these compounds, by human metabolism or by environmental conditions, can give rise to transformation products more persistent and/or more hazardous than the parent compounds [9-10]. Therefore, it is necessary to obtain information on both the parent compounds as well as their possible transformation products. For ibuprofen, more than 10 transformation products have been identified [11-13], of which 4'-isobutylacetophenone (4-IBAP) is one of the most important ones since it causes adverse effects in the central nervous system and presents high dermal absorption [14]. For diclofenac, several transformation products have been identified produced by different mechanisms of oxidation and photo-oxidation [15-17] with diclofenac amide being very common in these transformation pathways. Finally, ketoprofen has several known transformation products of which 3-acetobenzophenone (3-AcBP) is one of the most important ones [18-20].

Although there are many studies on the presence of NSAIDs in environmental samples [5-8], to our knowledge, data about the presence of NSAID transformation products in these samples are very scarce. 4-IBAP has been detected in wastewater in Sweden in concentrations between 8-540 ng L<sup>-1</sup> [21-22] and diclofenac amide in wastewater and river water in Pakistan in concentrations 30-400 ng L<sup>-1</sup> [17].

69           The main difficulties when studying the transformation products of  
70 pharmaceuticals in environmental matrices are linked to the complexity of wastewater  
71 and sludge samples, and the very low environmentally relevant concentrations ( $\text{ng L}^{-1}$ ,  
72  $\text{ng g}^{-1}$ ), which can generate problems in relation to the analytical sensitivity and/or  
73 selectivity. For these reasons, sample preparation is necessary in order to obtain  
74 sufficient enrichment as well as clean-up. For aqueous samples, generally, solid phase  
75 extraction (SPE) is the most common technique applied for NSAID transformation  
76 products [16-18]. However, this technique possesses some disadvantages such as  
77 using high amounts of organic solvent, being time consuming and providing limited  
78 enrichment of the target analytes implying additional pre-concentration steps. Sludge  
79 samples are usually lyophilized and extracted using pressurized liquid extraction  
80 (PLE) which requires additional clean-up of the extract with SPE due to its low  
81 selectivity [23-25] thus resulting in a tedious and complex procedure. Hollow fiber  
82 liquid-phase microextraction (HF-LPME) is an attractive alternative technique for  
83 environmental sample preparation. This technique only consumes negligible amounts  
84 of solvents, avoids sample carryover (by the use of disposable membranes), has a low  
85 cost and has been shown to provide good clean-up efficiency, high selectivity, and  
86 high enrichment factors for pharmaceuticals and their transformation products in  
87 water and wastewater [5, 21, 26]. A further advantage is that HF-LPME is also  
88 applicable for direct extraction of trace analytes from raw as well as digested sludge,  
89 saving large amounts of time and work. This has been demonstrated in several  
90 publications [7-8, 27-28]. HF-LPME can be applied in different configurations  
91 depending on the application [29-30]. In the two-phase mode, a liquid organic  
92 acceptor phase fills the lumen of a microporous membrane fiber and is immobilized in  
93 membrane pores to extract the analytes from an aqueous donor phase (sample). This  
94 mode is preferably used for neutral and/or more hydrophobic organic compounds ( $\log$   
95  $K_{ow} \geq 3$ ).

96           In a previous work a two-phase HF-LPME method was developed for the  
97 extraction of 4-IBAP from wastewater [21]. In the present paper we present the  
98 development of a new method, including also two other hydrophobic NSAID  
99 transformation products (3-AcBP and diclofenac amide) and applying a significantly  
100 shorter extraction time (3 h compared to 7 h in the previous study). The method was  
101 successfully applied for the determination of target analytes in wastewater as well as  
102 in sewage sludge.

### 103 2. Material and methods.

#### 104 2.1. Chemicals and solutions.

105 Diclofenac amide (CAS: 15362-40-0) was purchased from TRC Inc. (North York,  
106 Canada), 4-isobutylacetophenone (4-IBAP, CAS: 38861-78-8), 3-AcBP (CAS:  
107 66067-44-5) and 4-butylacetophenone (CAS: 37920-25-5) used as internal standard  
108 (IS), were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Toluene, n-hexane,  
109 isooctane and acetone were purchased from Scharlau Chemie (Barcelona, Spain).  
110 Chloroform, 1-octanol and 2-heptanone were purchased from Sigma-Aldrich  
111 (Steinheim, Germany). Sodium chloride, sodium hydroxide and sulfuric acid were  
112 purchased from Across Organics (Gheel, Belgium). Reagent water was obtained from  
113 a MilliQ water purification system (Millipore, Billerica, MA, USA). The Q3/2  
114 Accurel PP polypropylene hollow fiber membranes with an inner diameter of 600 µm,  
115 200 µm of wall thickness and 0.2 µm pore size were obtained from Membrana  
116 (Wuppertal, Germany).

117 Standard stock solutions of 4-IBAP, 3-AcBP and IS were prepared in hexane  
118 at 1000 mg/L, and diclofenac amide stock solution was prepared in chloroform at 245  
119 mg/L. Working solution were prepared weekly by appropriate dilution in hexane for  
120 calibration and in hexane: acetone (1:50) for samples spiking. Stock solutions were  
121 stored in the freezer at -20°C and working solution in the fridge at 6°C.

122

#### 123 2.2. Sample collection.

124 Influent water samples were collected prior to the initial screen at five WWTPs in  
125 southern Sweden: Sjölanda, Klagshamn, Källby, Kävlinge and Ellinge in June 2013.  
126 Klagshamn and Sjölanda WWTPs are situated in the city of Malmö, the third largest  
127 city in Sweden. Sjölanda receives wastewater from approximately 420,000 population  
128 equivalents (p.e.) from Malmö as well as nearby cities. Klagshamn receives  
129 wastewater from approximately 60,000 p.e. from Malmö and the close town Vellinge.  
130 Källby WWTP is located in the city of Lund and treats the wastewater of  
131 approximately 80,000 p.e. from Lund as well as surrounding villages. Kävlinge  
132 WWTP is situated in the town of Kävlinge and receives the wastewater of  
133 approximately 30,000 p.e.. Finally, Ellinge WWTP serves the community of Eslöv  
134 and Procordia Food's production plant. Depending on the season, the load varies from  
135 approximately 25,000 p.e. to 100,000 p.e. At Ellinge WWTP, samples were also  
136 collected from the water entering as well as exiting the conventional activated sludge

1 137 treatment (CAS) and of digested sludge from the centrifuge providing final  
2 138 dewatering. Samples were collected in glass bottles (wastewater) and plastic bottles  
3 139 (sludge), transported to the laboratory, and kept at 4 °C in darkness until analysis. All  
4  
5 140 experiments were performed within a few days.

6  
7 141 Sludge samples were pre-treated according to the method developed by  
8  
9 142 Sagristà et al. [7]. Aliquots of 2 g (wet weight) of homogenized digested sludge were  
10 143 mixed with 100 mL of reagent water and stirred for 18 hours at 660 rpm to reach  
11 144 partitioning equilibrium of the analytes between the solid and aqueous phase.  
12  
13 145 Afterwards, the slurry samples were subjected to the two-phase HF-LPME extraction  
14  
15 146 procedure described below.

16  
17  
18  
19 147

### 20 148 2.3. Hollow-fiber liquid phase microextraction (HF-LPME).

21  
22  
23 149 The HF-LPME assembly designed for the extraction of NSAID transformation  
24 150 products is shown in Fig. 1. . Before the extraction, the hollow fibers were cut into 6  
25 151 cm pieces and cleaned with acetone to remove any possible contaminants whereafter  
26 152 the acetone was allowed to evaporate completely. To carry out the extraction, one end  
27 153 of the cleaned fiber was attached to a medical syringe needle (100 Sterican, inner  
28 154 diameter of 0.7 mm x 50 mm, Scantec lab AB, Gothenburg, Sweden). These needles  
29 155 were found to allow for a quick and tight connection to the hollow fiber. By a 1 mL  
30 156 medical syringe, solvent was passed through the fiber to ensure that the lumen of the  
31 157 membrane was filled with the organic phase. Then, the other end of the fiber was  
32 158 joined to another medical syringe needle. After that, the pores were impregnated with  
33 159 the organic solvent for around 60 seconds and the system (U-shaped) was dipped into  
34 160 reagent water to remove the organic solvent excess. The U-shaped fiber was placed  
35 161 into the aqueous sample (100 mL) for extraction. At the end of the extraction, the  
36 162 fiber was removed from the donor solution and was carefully dried with a piece of  
37 163 paper to avoid water traces in the extract. The acceptor phase was collected into a 1.5  
38 164 mL vial attached to a 250 µL insert by pushing air through the fiber with a 10 mL  
39 165 syringe. A total of 5 µL of the organic extract was transferred to another GC vial  
40 166 containing 45 µL of hexane and internal standard at 10 µg/L. Finally, 2 µL volume of  
41 167 this solution was injected into the GC-MS.

42  
43  
44  
45  
46  
47 168

48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60 169

170 **2.4. Instrumentation.**

171 The extracts were analyzed by a 45X series gas chromatograph equipped with a  
172 split/splitless injector, autosampler CP-8400 and a Scion-TQ mass detector (Bruker  
173 Corporation, Fremont, CA). Target analytes were separated using a Vf-1MS Factor  
174 four column (Varian, Darmstadt, Germany), 30 m x 0.32 mm with a phase thickness  
175 of 0.25  $\mu\text{m}$ . Helium carrier gas (purity 99.9999%, Strandmøllen, Klampenborg,  
176 Denmark) was maintained at a constant flow rate of 1.5 mL/min. The  
177 chromatographic program was from 60 °C, with a hold for 2 min, increasing at 10  
178 °C/min to 130°C, with a hold for 1 minute and a final rate of 40 °C/min to 280 °C,  
179 hold for 3 min. The total chromatographic run time was 18 minutes. A volume of 2  
180  $\mu\text{L}$  was injected in splitless mode (splitless time: 2 minutes). The temperature for  
181 injector and transfer line was 280 °C and for the ion source 230 °C. The MS was  
182 operated in the electron impact ionization (EI) mode (70 eV). Analysis was performed  
183 in the selected ion monitoring (SIM) mode using the characteristic ions given in Table  
184 1.

185

186 **3. Results and discussion.**

187 **3.1. Method optimization.**

188 The analytes of interest are hydrophobic and non-charged compounds and hence  
189 easily extracted from water into an organic solvent. For this type of compounds a two-  
190 phase liquid membrane extraction system is the most suitable. To determine the most  
191 favorable HF-LPME conditions for the analysis of the samples a univariate  
192 optimization approach was performed. The experiments were performed in reagent  
193 water and wastewater samples spiked with 1  $\mu\text{g/L}$  of each analyte. All results were  
194 expressed as mean values of three replicates.

195

196 **3.1.1. Selection of organic solvent.**

197 The type of organic solvent in the hollow fiber is important to achieve high extraction  
198 efficiency. There are several requirements for organic phase selection: The organic  
199 solvent should be immobilized in the hollow fiber pores; it should be immiscible with  
200 water and non-volatile to avoid solvent loss during the extraction. Also, the acceptor  
201 phase should be selective towards the analytes of interest. Based on these

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

202 considerations, five organic solvents were tested to extract the analytes (hexane,  
203 isooctane, toluene, 1-octanol and 2-heptanone). As can be seen in Fig. 2., toluene and  
204 1-octanol gave the best results but the experiments showed that toluene was lost  
205 during the extraction to a larger extent than 1-octanol. Consequently 1-octanol was  
206 chosen for further experiments.

207  
208 **3.1.2. Extraction time.**

209 The amounts of the analytes transferred into the organic solvent from the donor phase  
210 are expected to increase with increasing exposure time in the sample and reach  
211 maximum at the equilibrium state. The effect of extraction time on the extraction  
212 efficiency was evaluated from 15 to 90 minutes in reagent water spiked with the three  
213 analytes. The relative peak area of the analytes increased during the first 45 minutes  
214 and decreased for longer extraction times. The reason for the decrease of the  
215 extraction efficiency and also larger RSD values may be the loss of the organic  
216 solvent from the membrane. However, the mass transfer from the donor phase to the  
217 acceptor phase is affected by the sample matrix so the extraction time was also  
218 evaluated from 45 minutes to 300 minutes in wastewater. Fig. 3 shows that 180  
219 minutes is the optimum value. Therefore, 180 minutes was selected for subsequent  
220 experiments.

221  
222 **3.1.3. Stirring speed.**

223 Agitation of the sample solution may accelerate the mass transfer of extracted  
224 analytes from the sample to the organic solvent and reduce the time to reach  
225 equilibrium. To estimate the influence of the stirring speed, four stirring speeds from  
226 330 rpm to 660 rpm were investigated in the experiments. As it can be seen in Fig. 4,  
227 the relative area of the analytes increased with increasing stirring speed to 550 rpm,  
228 while above this value there was a decrease. However, when the agitation speed was  
229 550 rpm, standard deviation values were too high so 440 rpm was the stirring speed  
230 chosen for the following experiments.

231  
232  
233  
234

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

235 **3.1.4. Fiber length (acceptor phase volume).**

236 The fiber length is directly related to the acceptor phase volume and to the extraction  
237 efficiency. The effect of the organic solvent volume was studied with length values  
238 from 4 to 20 cm. One centimeter of hollow fiber membrane can hold approximately 8  
239  $\mu\text{L}$  of organic solvent depending of the density and viscosity of the acceptor phase.  
240 Fig. 5. shows that 6 cm of fiber length provides the best results for the analytes.  
241 Hence, this length value was chosen for further experiments.

242  
243 **3.1.5. Salt addition.**

244 Salt addition to the sample may have different effects. First, the addition of salt can  
245 reduce the amount of water available to dissolve the analytes due to the formation of  
246 hydration spheres around the ionic salt molecules and can improve the extraction  
247 efficiency for the target analytes into the organic phase. On the other hand, the  
248 addition of salt can lead to higher ionic strength in the sample (“salting out effect”)  
249 that can improve the extraction efficiency due to changes in the physical properties of  
250 the sample. Different amounts of salt (NaCl) from 0% to 15% were studied and the  
251 relative areas decreased with increasing salt concentration in reagent water. However,  
252 the same amounts of salt in the wastewater did not have any effect on the extraction  
253 efficiency and experiments showed that salt prevents loss of solvent from the  
254 membrane. Hence, for subsequent experiments 5% of salt was added to the samples  
255 for extractions.

256  
257 **3.1.6. Temperature and pH.**

258 The temperature has a significant effect on both the kinetics and thermodynamics of  
259 the extraction process. The mass transfer coefficients and rate constants are usually  
260 enhanced with increasing temperature; as a result, an increase of the sample  
261 temperature may improve extraction efficiency. The effects of temperature were  
262 studied from 25 to 50 °C but the relative areas were not affected by this increase so  
263 the following analyses were performed at room temperature.

264 Considering the structure and chemical properties of the analytes it is expected  
265 that the pH does not affect the extraction efficiency significantly. The pH studied

266 varied from 2 to 9. As it was expected no effect of sample pH on the extraction was  
267 observed. Therefore, no pH adjustment was done to the samples.

268

269 **3.2. Validation of the method.**

270 In order to evaluate the practical applicability of the proposed method, enrichment  
271 factor ( $E_e$ ), linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ),  
272 repeatability and reproducibility were studied in wastewater free of target analytes.  
273 Results are shown in Table 2.

274 In two-phase LPME methods, the enrichment factor is used to evaluate the  
275 effectiveness of the procedure of extraction, see Eq. (1). This parameter is defined as  
276 the ratio of the concentration of analyte in the acceptor phase ( $c_a$ ) after the extraction  
277 divided by the initial concentration in the sample (donor phase) before extraction ( $c_d$ ).

278 
$$E_e = \frac{c_a}{c_d} \quad (1)$$

279 The linearity of the method was evaluated over the concentration range 10–500 ng  
280 L<sup>-1</sup>. Overall, linearity was very good along the whole evaluated range with the  
281 determination coefficients ( $R^2$ ) ranging between 0.9968 and 0.9997. The detection  
282 and quantification limits (LODs and LOQs, respectively) were calculated with the  
283 data generated in the linearity studies. From the calibration function, LOD and LOQ  
284 were calculated as the analyte concentration that corresponds to a signal equal to “a +  
285 3 Sy/x” and “a + 10 Sy/x” respectively, where “a” is the origin ordinate, and “Sy/x”  
286 indicates the random errors for the slopes of the regression lines fitted to the  
287 calibration points. The values range from 10.5 to 41.1 ng L<sup>-1</sup> for LOD and from 35.0  
288 to 137.1 ng L<sup>-1</sup> for LOQ.

289 The repeatability was studied by analyzing three wastewater samples and  
290 reagent water spiked at 1 µg L<sup>-1</sup>. The RSD values were lower than 10.3% in reagent  
291 water and 15.6% in wastewater. The reproducibility within two days was studied by  
292 analyzing six wastewater samples and reagent water with a final concentration of 1 µg  
293 L<sup>-1</sup>. The RSD values for the analytes in this case were lower than 12.2 and 16.1%,  
294 respectively.

295

296

297

298

299 **3.3. Real sample analysis.**

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

300 The two-phase LPME method developed in this work was applied to the  
301 determination of target analytes in influent wastewater from five WWTPs in southern  
302 Sweden. The results are shown in table 3. According to these results, 3-AcBP was the  
303 most frequently detected compound, found at concentrations > LOD in the influent to  
304 four of the five studied WWTPs. The main pathway of pharmaceuticals into  
305 wastewater is human excretion via urine and feces following consumption. 3-AcBP is  
306 not a major human metabolite of ketoprofen although it has been shown to form in  
307 rats in very low amounts, corresponding to approx. 0.03 % of the administered  
308 ketoprofen dose [31]. It has however been identified as a major phototransformation  
309 product of ketoprofen, formed even after very short exposure to light [18]. In a survey  
310 by Falås et. al., ketoprofen showed median influent concentrations > 1 µg L<sup>-1</sup> in a  
311 screening of data from 162 Swedish WWTPs [32]. There is thus potential for  
312 phototransformation processes to take place. However, in all cases, the sampling in  
313 our study was performed of the influent water directly after reaching the WWTPs via  
314 underground sewage lines, which means that the exposure to light has been  
315 negligible. We thus consider it more likely that the 3-AcBP found in the influents is  
316 the result of human metabolism. The detected concentrations in our study are approx.  
317 60 ng L<sup>-1</sup>, which corresponds to around 0.06 % of the median ketoprofen  
318 concentration found in WWTP influents. The ibuprofen transformation product 4-  
319 IBAP was found in the highest amount of all analytes (197 ng L<sup>-1</sup>) in the influent to  
320 Sjöhlunda WWTP, although not detected or below LOD at the four other WWTPs.  
321 Previous studies show a similar pattern: In 2007, Zorita et al. [21] only detected 4-  
322 IBAP in two out of four samples collected from different parts of the sewage system  
323 of Kristianstad city in southern Sweden in rather low concentrations (26.5 and 39.7 ng  
324 L<sup>-1</sup> respectively). In a new study in 2009, the compound was detected in the influent  
325 to Kristianstad WWTP at three out of five sampling occasions in significantly higher  
326 concentrations (320-540 ng L<sup>-1</sup>) [22]. The occurrence of this compound thus shows an  
327 intermittent pattern. Like 3-AcBP, 4-IBAP is a phototransformation product and not a  
328 human metabolite. It is however often found in low amounts in ibuprofen  
329 preparations, which could be the reason for its presence in wastewater [22]. Finally,  
330 diclofenac amide was only detected in a concentration > LOD at Ellinge WWTP. No  
331 clear trend between the studied WWTPs can be observed, except that none of the

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

332 analytes were detected in the influent to Källby WWTP. It is hard to find a  
333 satisfactory explanation for this observation since the sewage system of Lund city  
334 does not differ in principle from the other cities and we find it highly unlikely that the  
335 consumption of the NSAIDs would be significantly lower in Lund than its  
336 neighboring cities. Since this study is performed by screening of several WWTPs  
337 based on sampling at a single occasion we therefore attribute the absence of the  
338 analytes in the Källby influent to the overall intermittent detection of these analytes in  
339 wastewater. This behavior in its turn is most likely due to these compounds not being  
340 main human metabolites, but present in the water either by their occurrence as  
341 contaminants in consumed preparations of the NSAIDs or potential microbial  
342 transformation processes in the sewage system, which could be highly dependent on  
343 the biotic and abiotic conditions, changing from day to day.

344       These results show that non-detectable or very low amounts of these compounds  
345 reach the WWTPs via wastewater, which would imply that they probably are of minor  
346 environmental concern. However, studies have revealed that NSAIDs undergo  
347 substantial biological transformation within WWTPs [33-34]. Previous work has for  
348 instance shown the transformation of diclofenac into diclofenac amide during  
349 activated sludge batch experiments [35]. Due to the hydrophobicity of the  
350 investigated analytes they could also have a potential to accumulate in the sludge,  
351 which would provide another pathway into the environment via the use of sludge as a  
352 fertilizer in agriculture. To investigate this, samples of water entering as well as  
353 exiting the activated sludge treatment and samples of dewatered, digested sludge were  
354 collected from Ellinge WWTP and analyzed. On this occasion, only diclofenac amide  
355 was detected in the samples. As can be seen in table 4, the concentration increased  
356 during the activated sludge treatment resulting in  $132 \text{ ng L}^{-1}$  in the secondary effluent,  
357 thus implying a formation of this compound during the treatment. In the digested  
358 sludge, also only this compound was detected at a concentration of  $183 \text{ ng g}^{-1}$ ,  
359 showing its potential to accumulate in the sludge.

360

#### 361 4. Conclusions.

362 In this work, a two-phase HF-LPME method was developed and validated for the  
363 direct extraction of three hydrophobic NSAID transformation products from  
364 wastewater and sludge. Analysis of influent water from five Swedish WWTPs

1 365 revealed the presence of these compounds in most samples, although in very low  
2 366 amounts. It can hence be concluded that the input of these compounds to WWTPs is  
3 367 of minor concern. However, analysis of water from the activated sludge treatment and  
4 368 digested sludge showed that at least one of the analytes, diclofenac amide, has a  
5 369 potential to form during wastewater treatment and accumulate in sludge. Significant  
6 370 environmental release via WWTPs can thus not be totally excluded why further  
7 371 studies regarding the formation of these compounds and their partitioning into sludge  
8 372 are motivated.

### 15 373 **Acknowledgments.**

16 374 J.M. Manso-Sayago thanks the projects P08-FQM-03554 and P09-FQM-04659 from  
17 375 “Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa (Junta de Andalucía) and the Spanish  
18 376 Ministry of Science and Education (MEC)” project CTM2009-12858-C02-01 for  
19 377 funding. J.M. Manso-Sayago is very grateful to the “Consejería de Innovación  
20 378 Ciencia y Empresa (Junta de Andalucía, P09-FQM-04659)” for a predoctoral grant.  
21 379 The staff at VA Syd and Kävlinge kommun is kindly acknowledged for help with the  
22 380 sampling.  
23 381

### 31 382 **5. References.**

- 32 383 [1] Nikolaou, A., *Global Nest Journal*, 15 (2013) 1-12.  
33 384 [2] Ortiz de García, S., Pinto Pinto, G., García Encina, P., Irusta Mata, R., *Sci. Total*  
34 385 *Environ.*, 444 (2013) 451-465.  
35 386 [3] Yu, Y., Wu, L., *Talanta*, 89 (2012) 258-263.  
36 387 [4] Gilart, N., Marcé, R. M., Fontanals, N., Borrull, F., *Talanta*, 110 (2013) 196-201.  
37 388 [5] Villar Navarro, M., Ramos Payan, M., Fernández-Torres, R., Bello-López, M.A.,  
38 389 Callejón M., Guiráum- Pérez, M.A., *Electrophoresis*, 32 (2011) 2107-2113.  
39 390 [6] Olives, A. I., González-Ruiz, V., Martín, M. A., *Anti-Inflamm. Anti-Allergy*  
40 391 *Agents Med. Chem.*, 11 (2012) 65-95.  
41 392 [7] Sagristà, E., Larsson, E., Ezoddin, M., Hidalgo, M., Salvadó, V., Jönsson, J.Å., *J.*  
42 393 *Chromatogr. A.*, 1217 (2010) 6153-6158.  
43 394 [8] Larsson, E., Rabayah, A., Jönsson J.Å., *J. Environ. Prot.* 4 (2013) 946-955  
44 395 [9] Fatta-Kassinos, D., Vasquez, M.I., Kümmerer, K., *Chemosphere*, 85 (2011) 693-  
45 396 709.  
46 397 [10] Kosjek, T., Heath, E., *Trends Anal. Chem.*, 27 (2008) 807-820.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

398 [11] Szabó, R. K., Megyeri, C., Illés, E., Gajda-Schranz, K., Mazellier, P., Dombi,  
399 A., *Chemosphere*, 84 (2011) 1658-1663.

400 [12] Madhavan, J., Grieser, F., Ashokkumar, M., *J. Hazard. Mater.*, 178 (2010) 202-  
401 208.

402 [13] Caviglioli, G., Valeria, P., Brunella, P., Sergio, C., Attilia, A., Gaetano, B., *J.*  
403 *Pharm. Biomed. Anal.*, 30 (2002) 499-509.

404 [14] Ruggeri, G., Ghigo, G., Maurino, V., Minero, C., Vione, D., *Water. Res.*,  
405 DOI:10.1016/j.watres.2013.07.031

406 [15] Minetto, L., Mayer, F.M., Mallmann, C. A., Martins, A. F., *Clean - Soil, Air,*  
407 *Water*, 40 (2012) 950-957.

408 [16] Eriksson, J., Svanfelt, J., Kronberg, L., *J. Photochem. Photobiol.*, 86 (2010) 528-  
409 532.

410 [17] Scheurell, M., Franke, S., Shah, R.M., Hühnerfuss, H., *Chemosphere*, 77 (2009)  
411 870-876.

412 [18] Kosjek, T., Perko, S., Heath, E., Kralj, B., Zigon, D., *J. Mass Spectrom.*, 46  
413 (2011) 391-401.

414 [19] Nakajima, A., Tahara, M., Yoshimura, Y., Nakazawa, H., *J. Photochem.*  
415 *Photobiol. A: Chem.*, 174 (2005) 89-97.

416 [20] Dvořák, J., Hájková, R., Matysová, L., Nováková, L., Koupparis, M.A., Solich,  
417 P., *J. Pharm. and Biomed. Anal.*, 36 (2004) 625-629.

418 [21] Zorita, S., Barri, T., Mathiasson, L., *J. Chromatogr. A* 1157 (2007) 30-37

419 [22] Zorita, S., Mårtensson, L., Mathiasson, L., 407 (2009) *Sci. Total Environ.* 2760-  
420 2770

421 [23] Martín, J., Camacho-Muñoz, D., Santos J.L., Aparicio, I., Alonso, E., *J. Hazard.*  
422 *Mater.*, 239 (2012) 40- 47.

423 [24] Jelic´, A., Gros, M., Ginebreda, A., Céspedes-Sánchez, R., Venturad, F.,  
424 Petrovic´ M., Barceló, D., *Water. Res.* 45 (2011) 1165-1176

425 [25] Jelic. A., Petrovic´, M., Barceló, D., *Talanta*, 80 (2009) 363-371.

426  
427 [26] Es'haghi, Z., *Anal. Chim. Acta*, 641 (2009) 83-88.

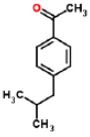
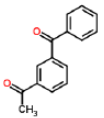

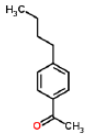
428 [27] Sagristà, E., Cortés, J.M., Larsson, E., Hidalgo, M., Salvadó, V., Jönsson, J.Á., *J.*  
429 *Sep. Sci.*, 35 (2012) 2460-2468.

430 [28] Vasskog T., Bergersen O., Anderssen T., Jensen E., Eggen, T., *Waste Manage.*  
431 28 (2009) 2808-2815

1 432 [29] Jönsson, J.Å., in: Pawliszyn, J., Lord, H. L. (Eds.), Comprehensive Sampling and  
2 Sample Preparation, Volume 2, Elsevier, Academic Press, Oxford, UK, 2012, pp  
3 461-474.  
4  
5 435 [30] Bello-López, M. A., Ramos-Payán, M., Ocaña-González, J. A., Fernández-  
6 Torres, R., Callejón-Mochón, M., Anal. Letters, 45 (2012) 804-830.  
7  
8 436 [31] Komuro, M., Higuchi, T., Hirobe, M., Bioorg. Med. Chem., 3 (1995) 61-65.  
9  
10 437 [32] Falás, P., Andersen H.R., Ledin A., la Cour Jansen, J., 66 (2012) Water Sci.  
11 Technol. 783-791  
12  
13 438 [33] Ferrando-Climent, L., Collado, N., Buttiglieri, G., Gros, M., Rodríguez-Roda, I.,  
14 Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D., Sci. Total Environ. 438 (2012) 404-413.  
15  
16 440 [34] Lahti, M., Oikari A., Arch. Environ. Contam. Toxicol. 61 (2011) 202-210.  
17  
18 441 [35] Kosjek T., Heath E., Kompare, B., Anal. Bioanal. Chem. 387 (2007) 1379-1387.  
19  
20 442  
21  
22 443  
23  
24 444  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Tables

Table 1. Names, chemical structures, molecular weights (Mw), octanol/water partition coefficient (log K<sub>ow</sub>) and SIM target ions.

Compound	Structure	Mw	log K <sub>ow</sub> <sup>†</sup>	Quantifier ion (m/z)	Qualifier ion (m/z)
4-isobutylacetophenone		176.24	3.54 ± 0.23	161	176
3-AcBP		224.25	3.02 ± 0.33	105	209
Diclofenac amide		278.13	3.00 ± 0.37	214	242
4-butylacetophenone (Internal Standard)		176.25	3.72 ± 0.22	161	176

<sup>†</sup> Values calculated using a computer program: ACDLabs 12.0, Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, Canada.

446

447

Table 2. Analytical performance of the optimized HF-LPME method.

Analyte	E <sub>s</sub>	R <sup>2</sup>	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)	Repeatability (%) <sup>a,b</sup>		Reproducibility (%) <sup>a,c</sup>	
					Reagent Water	Effluent Water	Reagent Water	Effluent Water
4-IBAP	965	0,9997	10.5	35.0	4.7	8.0	7.2	9.0
3-AcBP	519	0,9981	18.6	62.1	10.3	12.4	12.2	14.9
Diclofenac amide	315	0,9968	41.1	137.1	3.4	15.6	9.5	16.1

<sup>a</sup> concentration 1 µg/L

<sup>b</sup> n=3

<sup>c</sup> n=6

**Table 3.** Concentration of the studied NSAIDs transformation products in influent water from WWTPs in southern Sweden.

Analyte	Concentration (ng/L)				
	Sjölunda	Källby	Ellinge	Klagshamn	Kävlinge
4-IBAP	196.7 ± 10.7	n.d.	n.d.	< LOD (6,3)	< LOD (1,3)
3-AcBP	55.4 ± 12.9	n.d.	88.8 ± 23.2	46.6 ± 13.0	57,5 ± 18.8
Diclofenac amide	n.d.	n.d.	54,5 ± 20.2	< LOD (27,5)	< LOD

448

**Table 4.** Concentration of diclofenac amide in conventional activated sludge (CAS) influent water and effluent water and digested sludge from Ellinge WWTP.

Analyte	Concentration (ng/L)		Concentration (ng/g)
	CAS-in	CAS-out	Sludge
Diclofenac amide	108.8 ± 10.0	131.6 ± 5.5	182.8 ± 6.2

449

450

451

452

453

454

455

456

457

458

459

460

461

462

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

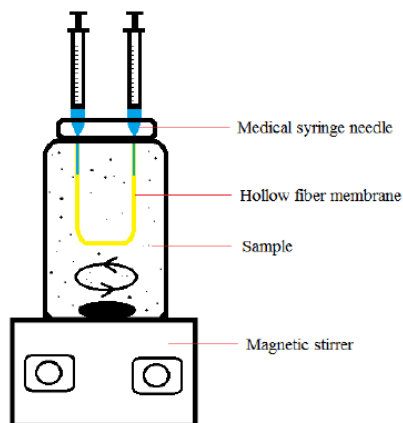
463	<b>Figure captions</b>
1	
2	464 <b>Fig. 1.</b> HF-LPME assembly designed for the extraction of hydrophobic analytes.
3	465
4	466 <b>Fig. 2.</b> Effect of the extraction solvents used for HF-LPME on the relative peak area
5	467 of the analytes. Error bars indicate the standard deviation (n = 3).
6	468
7	
8	469 <b>Fig. 3.</b> Effect of the extraction time on the relative peak area of the analytes in: a)
9	470 reagent water; b) wastewater. Error bars indicate the standard deviation (n = 3).
10	471
11	472 <b>Fig. 4.</b> Effect of the stirring speed on the relative peak area of the analytes. Error bars
12	473 indicate the standard deviation (n = 3).
13	474
14	
15	475 <b>Fig. 5.</b> Effect of the membrane length (organic phase volume) on the relative peak
16	476 area of the analytes. Error bars indicate the standard deviation (n = 3).
17	477
18	
19	478 <b>Fig. 6.</b> GC-MS-SIM chromatogram obtained from a spiked wastewater at 10 $\mu\text{g L}^{-1}$
20	479 after hollow fiber membrane extraction.
21	480
22	
23	481
24	
25	482
26	
27	483
28	
29	484
30	
31	485
32	
33	486
34	
35	487
36	
37	488
38	
39	489
40	
41	490
42	
43	491
44	
45	492
46	
47	493
48	
49	494
50	
51	495
52	
53	496
54	
55	497
56	
57	498
58	
59	499
60	
61	500
62	
63	501
64	
65	

502 **Figures**

503 (Note for the editors – figures should be printed in black/white in the printed journal,

504 black and white version will be provided upon acceptance).

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65



505

506 **Figure 1**

507

508

509

510

511

512

513

514

515

516

517

518

519

520

521

522

523

524  
1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
526  
18  
527  
19  
20  
21  
528  
22  
529  
23  
24  
530  
25  
531  
26  
532  
27  
533  
28  
534  
29  
535  
30  
536  
31  
537  
32  
538  
33  
539  
34  
540  
35  
541  
36  
542  
37  
543  
38  
544  
39  
545  
40  
546  
41  
547  
42  
548  
43  
549  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

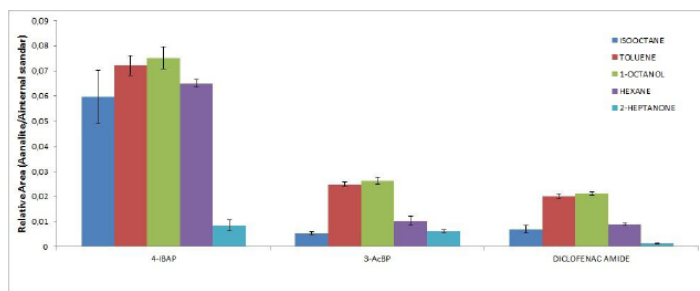


Figure 2.

550

551

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

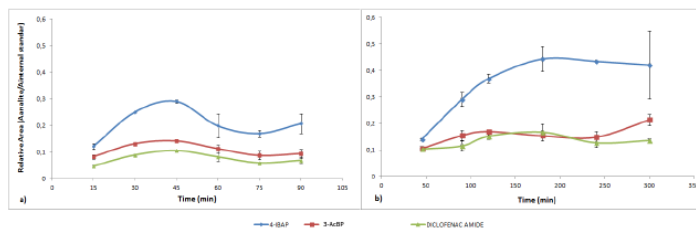


Figure 3.

552

553

554

555

556

557

558

559

560

561

562

563

564

565

566

567

568

569

570

571

572

573

574

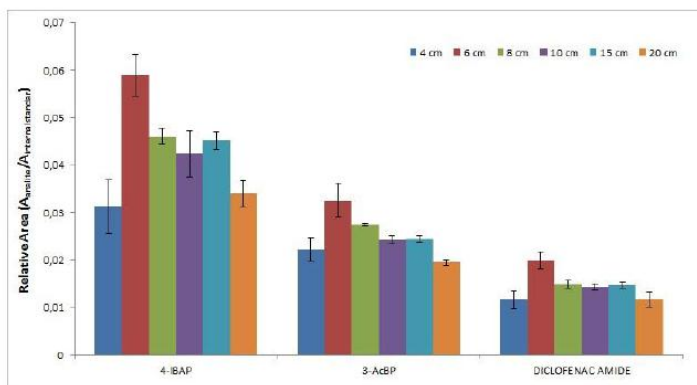
575

576

577

578

579



580

581 Figure 4.

582

583

584

585

586

587

588

589

590

591

592

593

594

595

596

597

598

599

600

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

601  
1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

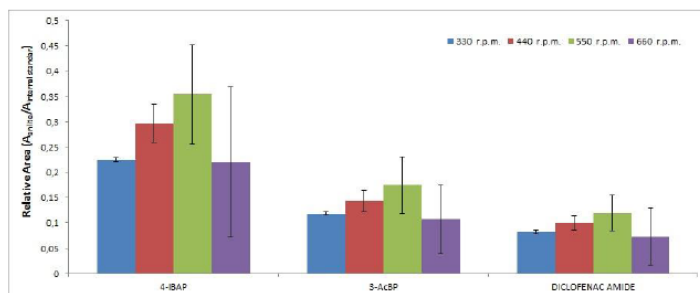
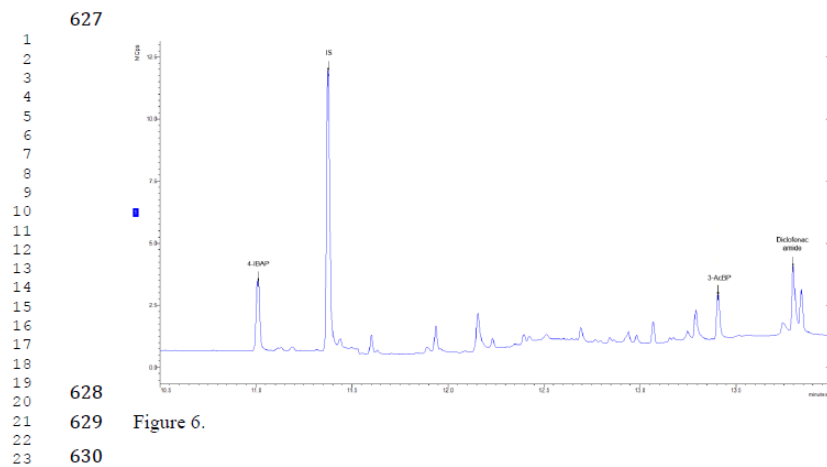


Figure 5.





*Conclusiones*

---



### Conclusiones generales de la Tesis

A partir de los resultados obtenidos en la presente memoria se pueden extraer las siguientes conclusiones generales:

1. Se ha optimizado un procedimiento analítico basado en el uso de membranas poliméricas porosas (HF-LPME) para la determinación de cuarenta compuestos orgánicos persistentes en muestras biológicas y de alimentos, entre los que se encuentran plaguicidas, PCBs y PBDEs, muchos de ellos incluidos en el Convenio de Estocolmo.
2. La optimización multivariante del método HF-LPME ha permitido definir condiciones instrumentales adecuadas para un amplio rango de compuestos, por lo que el método presenta gran aplicabilidad en el análisis de alimentos y fluidos biológicos.
3. El método HF-LPME propuesto presenta límites de detección en el rango de ng L<sup>-1</sup>, recuperaciones de alrededor del 100 % para la mayoría de los analitos, desviaciones estándar relativas entre 4 y 17 % y altos factores de enriquecimiento, los cuales superan las características analíticas de otros métodos similares descritos en la bibliografía.
4. El método propuesto es muy simple, barato, no presenta contaminación cruzada y es preciso, y la aplicación a muestras biológicas y alimentos pone de manifiesto que se puede utilizar para el análisis de rutina en la determinación de compuestos orgánicos persistentes en dichas muestras.
5. El método HF-LPME también se ha aplicado a la determinación de residuos de disolventes halogenados en aceite de oliva, obteniéndose límites de detección muy por debajo de los establecidos por la Unión Europea en relación con estos compuestos.
6. La combinación de la espectrometría de masas orgánicas con el detector de captura de electrones, ha permitido obtener alta sensibilidad instrumental e identificaciones inequívocas de los analitos.
7. Se ha desarrollado una estrategia analítica basada en la extracción múltiple con HF-LPME que ha permitido eliminar el efecto matriz en la extracción y disminuir los límites de detección, lo cual constituye un aspecto fundamental en el análisis de muestras complejas como el aceite.

8. Se ha optimizado y validado un método HF-LPME en dos fases para la extracción de tres productos de degradación de drogas no esteroideas antiinflamatorias: ketoprofeno, ibuprofeno y diclofenaco, en lodos y aguas residuales.

9. El método anterior se ha aplicado a un estudio llevado a cabo en Suecia, y pone de manifiesto la presencia de estos tres compuestos en 365 muestras de influentes analizadas, aunque en baja concentración.

10. El análisis del efluente de la planta de tratamiento de aguas residuales demostró la presencia de uno de los productos de degradación, diclofenaco amida, lo cual pone de manifiesto la formación de dicho compuesto durante el tratamiento del residuo y su acumulación en el lodo.

### **Conclusions**

The present Thesis allows obtaining the following general conclusions:

1. A new analytical procedure based on the use of porous polymeric membranes (HF-LPME) has been optimized for the determination of forty persistent organic pollutants in biological fluids and food samples, including pesticides, PCBs and PBDEs, the majority of them included into the Stockholm Convention.
2. The multivariate optimization of the HF-LPME method allows defining optimal conditions for a wide range of compounds, which demonstrate the applicability of the method for the analysis of food and biological fluids.
3. The proposed HF-LPME method presents detection limits around ng L<sup>-1</sup>, recoveries about 100 % for the majority of analytes, relative standard deviations from 4 to 17 % and high enrichment factors, which overcome the analytical features of similar methods described at the literature.
4. The proposed method is simple, cheap, does not present simple carryover, is precise, and together with the application to biological and food samples demonstrate that it can be used for routine analysis of persistent organic pollutants in this type of samples.
5. The HF-LPME has also been applied to the determination of halogenated solvent residues in olive oil, obtaining detection limits under those established by the European Union.
6. The combination of organic mass spectrometry with electron capture detector allows obtaining high sensitivity as well as unequivocal identification of the analytes.
7. An analytical strategy based in a multiple stepwise extraction by HF-LPME has been developed and applied to olive oil samples, which overcomes matrix effects and enhance sensitivity, which is crucial in this type of analysis.
8. A two-phase HF-LPME method was developed and validated for the direct extraction of three hydrophobic non-steroidal anti-inflammatory drugs transformation products from wastewater and sludge.
9. Analysis of influent water from five Swedish wastewater treatment plants revealed the presence of these compounds 365 in most samples, although in very low amounts.

## *Conclusiones*

---

10. The analysis of water from the activated sludge treatment and digested sludge showed that at least one of the analytes, diclofenac amide, has a potential to form during wastewater treatment and accumulate in sludge.





Los alimentos constituyen una importante interfase entre el medio ambiente y la salud, pudiendo producirse efectos en la salud humana derivados de la presencia de sustancias tóxicas originadas por la contaminación del medio ambiente. La presente Tesis se centra en el desarrollo y optimización de métodos analíticos y su aplicación al estudio de alimentos que pudieran contener compuestos orgánicos persistentes originados como consecuencia de la actividad humana, pero aplicables también a muestras biológicas, para la biomonitorización de los mismos. Por otra parte, también se ha evaluado la presencia de contaminantes emergentes en el medio ambiente, mediante la aplicación de estas metodologías a la determinación de fármacos y sus productos de degradación en aguas residuales.

Los métodos analíticos que se han desarrollado en esta Tesis se basan en el uso de membranas poliméricas porosas (HF-LPME), una de las técnicas más utilizadas en la actualidad debido a sus grandes ventajas, como altos factores de enriquecimiento, bajo coste, su aplicabilidad a un amplio rango de analitos y muestras y su consideración como técnica verde. Esta técnica analítica se ha combinado con métodos quimiométricos que han permitido optimizar las variables para alcanzar unas condiciones instrumentales de gran aplicabilidad, de forma que estos métodos pueden utilizarse para la extracción de compuestos diferentes a los considerados en esta Tesis. Asimismo, se ha desarrollado una estrategia basado en la extracción múltiple mediante HF-LPME que ha permitido mejorar la sensibilidad y evitar el efecto matriz, lo cual representa un problema importante en el análisis de muestras de alimentos y biológicas.

El acoplamiento de la cromatografía de gases con detectores de espectrometría de masas orgánicas y de captura de electrones, ha permitido mejorar considerablemente los límites de detección a la vez que una identificación inequívoca de los analitos. Las metodologías analíticas son simples, precisas y de bajo coste, por lo que pueden ser transferibles a los laboratorios de rutina relacionados con el control de calidad de alimentos, medio ambiente o la salud.



Unión Europea

