



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

TESIS DOCTORAL

Título
Métodos analíticos para la determinación de compuestos disruptores endocrinos
Autor/es
María Pilar Martínez Moral
Director/es
María Teresa Tena Vázquez de la Torre
Facultad
Facultad de Ciencias, Estudios Agroalimentarios e Informática
Titulación
Departamento
Química
Curso Académico
2014-2015

Tesis presentada como compendio de publicaciones. La edición en abierto de la misma NO incluye las partes afectadas por cesión de derechos



Métodos analíticos para la determinación de compuestos disruptores endocrinos, tesis doctoral

de María Pilar Martínez Moral, dirigida por María Teresa Tena Vázquez de la Torre (publicada por la Universidad de La Rioja), se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported. Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.



**UNIVERSIDAD
DE LA RIOJA**

MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS DISRUPTORES ENDOCRINOS

MARÍA PILAR MARTÍNEZ MORAL

MEMORIA DE TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTORA

2014

María Teresa Tena Vázquez de la Torre, Catedrática en Química Analítica de la Universidad de La Rioja,

Certifica:

Que la memoria titulada “*Métodos analíticos para la determinación de compuestos disruptores endocrinos*” que presenta María Pilar Martínez Moral, ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Química de la Universidad de La Rioja y reúne las condiciones exigidas para conseguir el título de doctor.

Logroño, a 2 de diciembre de 2014

Fdo: María Teresa Tena Vázquez de la Torre

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos CTM2007-60404 y CTM 2010-16935 del Ministerio de Educación y Ciencia dentro del Plan Nacional de Investigación Científica y Desarrollo e Innovación Tecnológica, cofinanciado con fondos FEDER.

Me gustaría hacer constar mi agradecimiento a dicha institución y a la Universidad de La Rioja por las ayudas ATUR, la ayuda para estancias internacionales y la beca FPI concedidas para la elaboración de esta tesis.

I would like to thank Jacob de Boer, Pim Leonards and Sicco Brandsma their kind collaboration in the work performed in the Institute for Environmental Studies (IVM) in Amsterdam.

Agradecimientos

La realización de esta tesis hubiera sido imposible sin la ayuda y colaboración, de diferentes maneras, de muchas personas.

En primer lugar, quiero agradecer a mi directora de tesis, a Teresa, la confianza depositada en mí desde el día que solicité realizar trabajos académicamente dirigidos en su grupo de investigación, pasando por los diferentes proyectos realizados hasta llegar a la realización de esta tesis doctoral. Para mí es un ejemplo a seguir de trabajo duro y superación, y a ella le debo que este trabajo se haya realizado. Muchas gracias por tantísimos conocimientos transmitidos, el ánimo y el apoyo durante todo este tiempo; no podía haber tenido una directora de tesis mejor.

También quiero agradecer a David, que me ayudó a dar los primeros pasos en el laboratorio y no ha dejado de ayudarme y animarme durante estos años en las numerosas crisis agudas que han surgido... muchísimas gracias por estar siempre ahí.

Los compañeros de laboratorio han sido imprescindibles, siempre dispuestos a echar una mano y a alegrar el día.... Ana G, Marivel, Diego, Laura, Txino, Crespo, Elisa, Tao, Patricia, Gorka, Liliana, Cristina S., Sofía, Nuria, Álvaro y todos los que nos habéis acompañado estos años en el 005; y los que hemos compartido tantos cafés y cervecitas, Rodrigo, Judith, Jorge, Maite, Puri, gracias por tantos buenos ratos.

José Miguel, Ana J, Cristina, tantas preocupaciones y malos ratos que hemos pasado... siempre los habéis sabido compensar con creces y han merecido la pena por haber encontrado tan buenos amigos como vosotros. Muchas gracias por todo.

También quiero agradecer a Pilar Blanco y al Servicio de Laboratorios, muy en especial a Ernesto y Nines, toda la ayuda brindada estos años.

Estoy muy agradecida a Pim Leonards, Jacob de Boer y Sicco Brandsma la posibilidad de colaborar en su grupo de investigación para realizar la estancia internacional. Durante mi estancia en Amsterdam encontré gente estupenda que me ayudó muchísimo y con la que compartí muchos buenos momentos, muchas gracias Kees, Jacco, Martin, Ana, Izaskun, Iker, Pepo, Pilar, Coraina, Simon, Antonio, Francisco por vuestra compañía en el IVM.

Por supuesto, quiero agradecer a mi familia, mis padres, mis hermanos, mis abuelos y tíos, que venciendo todas las dificultades que nos hemos encontrado en el camino, me han cuidado, educado y formado en todo lo que no se enseña en las aulas, y me han apoyado y ayudado durante toda mi vida.

Y para finalizar, gracias a los que tengo más cerca en mi día a día, porque han sufrido con mucha paciencia la falta de tiempo, el estrés, mal humor y los nervios... Adrián, Yoly, Joan, Cynthia, Carlos, Laura, Jose, Natalia S, Javi, Raquel, Juan, Diego, Edu, Débora, Pedro, Bea, Vane, Oscar, Nati, Natalia I, Cesar, cuadrilla del vaso al completo, muchas gracias por vuestra comprensión, ánimo y cariño... Me alegráis la vida. Ahora, por fin, podemos hacer todo lo que hemos dejado para ...cuando termine la tesis...

GRACIAS A TODOS

ÍNDICE

ÍNDICE	1
SUMMARY / RESUMEN	5
TEMÁTICA Y OBJETIVOS	17
1. INTRODUCCIÓN	21
1.1 COMPUESTOS DISRUPTORES ENDOCRINOS (EDCs)	21
1.1.1. Definición y regulación de EDCs	21
1.1.2. Clasificación y emisión de EDCs al medio ambiente	21
1.1.3. Exposición y efectos en la biosfera	25
1.1.4. Exposición en humanos y efectos sobre su salud	26
1.2. AVANCES EN TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE EDCs ..	31
1.2.1. Extracción selectiva con líquidos presurizados (SPLE)	32
1.2.2. Extracción asistida por ultrasonidos focalizados (FUSLE)	35
1.2.3. Microextracción en fase sólida con sorbentes empaquetados (MEPS) ..	38
2. ÉTERES DE DIFENILO BROMADOS (BDEs)	43
2.1 Estructura, propiedades y usos de los BDEs	43
2.2. Toxicidad de los BDEs	49
2.3. Acumulación en el medio ambiente y exposición a BDEs	50
2.4. Determinación de BDEs en diferentes tipos de muestras	54
2.5. Nuevos métodos para la determinación de BDEs en polvo doméstico y lodo de depuradora	59
2.5.1. Desarrollo y validación de un método basado en PLE selectiva para la determinación de BDEs en polvo doméstico	63
<i>Determination of brominated diphenyl ethers (from mono- to hexa-congeners) in indoor dust by pressurized liquid extraction with in cell clean-up and gas chromatography - mass spectrometry</i>	<i>67</i>

2.5.2. Desarrollo y validación de un método basado en FUSLE para la determinación de BDEs en polvo doméstico	95
<i>Focused ultrasound solid-liquid extraction and gas chromatography tandem mass spectrometry determination of brominated flame retardants in indoor dust</i>	<i>99</i>
2.5.3. Desarrollo y validación de un método basado en MEPS para la determinación de BDEs en lodo de depuradora	113
<i>Use of microextraction by packed sorbents following selective pressurized liquid extraction for the determination of brominated diphenyl ethers in sewage sludge by gas chromatography-mass spectrometry</i>	<i>117</i>
3. ALQUILFENOLES Y BISFENOL A.....	143
3.1. ALQUILFENOLES.....	143
3.1.1 Estructura, propiedades y fuentes de emisión de APs	143
3.1.2. Efectos en el medio ambiente y en la salud humana	145
3.1.3. Determinación de APs en diferentes tipos de muestras	146
3.2. BISFENOL A	149
3.2.1. Estructura y usos del BPA.....	149
3.2.2. Efectos en el medio ambiente y en la salud humana	150
3.2.3. Determinación de BPA en diferentes tipos de muestras.....	150
3.3. Nuevos métodos para la determinación de alquilfenoles y bisfenol A en lodo de depuradora	151
3.3.1. Desarrollo, validación y comparación de dos métodos, basados en PLE selectiva y en FUSLE, para la determinación de APs y BPA en lodo de depuradora.	155
<i>Focused ultrasound solid-liquid extraction and selective pressurized liquid extraction to determine bisphenol A and alkylphenols in sewage sludge by gas chromatography-mass spectrometry</i>	<i>159</i>
4. COMPUESTOS PERFLUORADOS (PFCs).....	183
4.1. Estructuras y usos de los PFCs	183
4.2. Fuentes y efectos de la emisión de PFCs	184

4.3. Determinación de PFCs en diferentes tipos de muestras.....	185
4.4. Nuevos métodos para la determinación de PFCs en embalajes de comida y lodo de depuradora	189
4.4.1. Desarrollo y validación de un método PLE-UPLC-MS/MS para la determinación de PFCs en embalaje de palomitas de maíz para microondas	193
<i>Determination of perfluorocompounds in popcorn packaging by pressurized liquid extraction and ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry</i>	197
4.4.2. Desarrollo y validación de un método basado en FUSLE para la determinación de PFCs en lodo de depuradora	215
<i>Focused ultrasound solid-liquid extraction of perfluorinated compounds from sewage sludge</i>	219
5. RETARDANTES DE LLAMA ORGANOFOSFORADOS	241
5.1. Estructura y usos de los OPFRs.....	241
5.2. Toxicidad y efectos de la emisión de OPFRs al medio ambiente.....	245
5.3. Determinación de OPFRs en diferentes tipos de muestras.....	246
5.4. Desarrollo y validación de un método para la determinación de BPA-BDPP, PBDPP y otros OPFRs en sedimentos y lodos de depuradora	251
<i>Development of an analysis method for two novel organophosphorus flame retardants in sediment and sewage sludge: resorcinol bis(diphenylphosphate) (PBDPP) and bisphenol A bis(diphenylphosphate) (BPA-BDPP), including other organophosphate flame retardants and plasticizers</i>	255
6. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS.....	273
ACRÓNIMOS.....	277
BIBLIOGRAFÍA.....	281

Summary / Resumen





SUMMARY

This thesis, entitled “*Analytical methods to determine endocrine disruptor compounds*”, is presented as a compilation of the scientific articles published during the research about the determination of endocrine disruptors in different kind of samples.

In the last years the concern about the occurrence of endocrine disruptor compounds (EDCs) in environmental samples and the human exposure to these compounds has increased. The goal of the research collected in this memory is to develop simpler, faster and more economical analytical methods for the determination of EDCs such as brominated diphenyl ethers (BDEs), alkylphenols (APs), bisphenol A (BPA), perfluorinated compounds (PFCs) or organophosphorus flame retardants (OPFRs) in different types of samples.

This memory begins with a general Introduction (in Spanish) that explains the importance of the determination of endocrine disruptor compounds and a brief description of the extraction techniques used: selective pressurized liquid extraction (SPLE), focused ultrasound solid-liquid extraction (FUSLE) and microextraction by packed sorbents (MEPS).

Then, there are different chapters for each family of compounds. Each chapter is composed by a description of the properties, uses and effects of the compounds in the environment and in human health and the state-of-the-art of their determination in different kind of samples (in Spanish), followed by the corresponding papers, in their original version (English).

The scientific articles included are the following:

Chapter 2: Brominated diphenyl ethers

1. Determination of brominated diphenyl ethers (from mono- to hexa- congeners) in indoor dust by pressurized liquid extraction with in cell clean-up and gas chromatography - mass spectrometry

M.P. Martínez, J.D. Carrillo and M.T. Tena, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397 (2010) 257-267.

2. *Focused ultrasound solid-liquid extraction and gas chromatography tandem mass spectrometry determination of brominated flame retardants in indoor dust*

M.P. Martínez and M.T. Tena, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 404 (2012) 289-295.

3. *Use of microextraction by packed sorbents following selective pressurized liquid extraction for the determination of brominated diphenyl ethers in sewage sludge by gas chromatography-mass spectrometry*

M.P. Martínez-Moral and M.T. Tena, *Journal of Chromatography A* 1364 (2014) 28-35.

Chapter 3: Alkylphenols and bisphenol A

4. *Focused ultrasound solid-liquid extraction and selective pressurized liquid extraction to determine bisphenol A and alkylphenols in sewage sludge by gas chromatography-mass spectrometry*

M.P. Martínez-Moral and M.T. Tena, *Journal of Separation Science* 34 (2011) 2513-2522.

Chapter 4: Perfluorinated compounds

5. *Determination of perfluorocompounds in popcorn packaging by pressurized liquid extraction and ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*

M.P. Martínez-Moral and M.T. Tena, *Talanta* 101 (2012) 104-109

6. *Focused ultrasound solid-liquid extraction of perfluorinated compounds from sewage sludge*

M.P. Martínez-Moral and M.T. Tena, *Talanta* 109 (2013) 197-202

Chapter 5: Organophosphorus flame retardants

7. *Development of an analysis method for two novel organophosphorus flame retardants in sediment and sewage sludge: resorcinol bis-(diphenylphosphate) (PBDPP) and bisphenol A bis (diphenylphosphate) (BPA-BDPP), including other organophosphate flame retardants and plasticizers*

M.P. Martinez-Moral, S. Brandsma, J. de Boer and P. Leonards.



Finally, the general conclusions of the work performed are presented in Chapter 6.



RESUMEN

Esta memoria de tesis doctoral se presenta en forma de compendio de publicaciones científicas según la normativa de la Universidad de La Rioja aprobada por Consejo de Gobierno el 22 de julio de 2005.

Siguiendo la norma para la presentación de tesis de la Universidad de la Rioja, esta memoria ha sido redactada en español. Con el fin de cumplir los requerimientos para la solicitud del título de “doctor con mención internacional” se incluye un resumen, los artículos científicos y las conclusiones redactados en inglés.

La memoria comienza describiendo la temática y los objetivos de la tesis. A continuación se encuentra una primera sección, *Introducción*, en la que se define el concepto de disruptor endocrino y se describen con detalle las técnicas de extracción empleadas y sus ventajas.

Después la tesis se divide en capítulos dedicados a cada una de las familias de compuestos estudiados: Éteres de difenilo bromados (BDEs), Alquilfenoles y bisfenol A (APs y BPA), Compuestos perfluorados (PFCs) y Retardantes de llama organofosforados (OPFRs). Cada capítulo consta de una breve introducción a los compuestos estudiados que describe sus propiedades, las fuentes de emisión, efectos en la salud, precedentes de métodos analíticos para su análisis, etc. A continuación se encuentra un pequeño resumen de los objetivos, resultados y conclusiones de cada trabajo seguido del artículo científico en su idioma original (inglés).

Las **publicaciones científicas** que se encuentran recogidas en esta memoria son:

Capítulo 2. Éteres de difenilo bromados

1. Determination of brominated diphenyl ethers (from mono- to hexa- congeners) in indoor dust by pressurized liquid extraction with in cell clean-up and gas chromatography - mass spectrometry

M.P. Martínez, J.D. Carrillo and M.T. Tena, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397 (2010) 257-267.

2. *Focused ultrasound solid-liquid extraction and gas chromatography tandem mass spectrometry determination of brominated flame retardants in indoor dust*

M.P. Martínez and M.T. Tena, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 404 (2012) 289-295.

3. *Use of microextraction by packed sorbents following selective pressurized liquid extraction for the determination of brominated diphenyl ethers in sewage sludge by gas chromatography-mass spectrometry*

M.P. Martínez-Moral and M.T. Tena, *Journal of Chromatography A* 1364 (2014) 28-35.

Capítulo 3. Alquilfenoles y bisfenol A

4. *Focused ultrasound solid-liquid extraction and selective pressurized liquid extraction to determine bisphenol A and alkylphenols in sewage sludge by gas chromatography-mass spectrometry*

M.P. Martínez-Moral and M.T. Tena, *Journal of Separation Science* 34 (2011) 2513-2522.

Capítulo 4. Compuestos perfluorados

5. *Determination of perfluorocompounds in popcorn packaging by pressurized liquid extraction and ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*

M.P. Martínez-Moral and M.T. Tena, *Talanta* 101 (2012) 104-109


6. *Focused ultrasound solid-liquid extraction of perfluorinated compounds from sewage sludge*

M.P. Martínez-Moral and M.T. Tena, *Talanta* 109 (2013) 197-202

Capítulo 5. Retardantes de llama organofosforados

7. *Development of an analysis method for two novel organophosphorus flame retardants in sediment and sewage sludge: resorcinol bis-(diphenylphosphate) (PBDPP) and bisphenol A bis (diphenylphosphate) (BPA-BDPP), including other organophosphate flame retardants and plasticizers*

M.P. Martínez-Moral, S. Brandsma, J. de Boer and P. Leonards.



Para finalizar se incluye un capítulo con las conclusiones generadas durante la elaboración de esta tesis.



Temática y objetivos



TEMÁTICA Y OBJETIVOS

En las últimas décadas, se ha incrementado la producción y empleo de diversos compuestos orgánicos como aditivos en la producción de plásticos, muebles, textiles, cosméticos, etc. Tras su uso, estos compuestos pueden ser liberados por diferentes vías al medio ambiente. Algunos de estos compuestos pueden tener efectos nocivos para la salud, por lo que su acumulación en el medio ambiente y en las cadenas alimentarias es preocupante. Entre estos compuestos se encuentran los denominados disruptores endocrinos (EDCs), que se ha demostrado que pueden interactuar con hormonas o imitar su mecanismo de acción, con consecuencias adversas para la salud. Algunos ejemplos representativos de estos contaminantes son los éteres de difenilo bromados (BDEs), los alquilfenoles (APs), el bisfenol A (BPA) y los compuestos perfluorados (PFCs), que han sido ampliamente usados en la industria. Por estos motivos, el estudio de estos compuestos en muestras medioambientales es de gran importancia para conocer los niveles de contaminación a los que están expuestas la vida animal, vegetal y humana.

El objetivo principal de esta tesis es el desarrollo, la optimización y la validación de métodos analíticos basados en extracción con líquidos presurizados (PLE) extracción selectiva con líquidos presurizados (SPLE), extracción asistida por ultrasonidos focalizados (FUSLE) o microextracción con sorbentes empaquetados (MEPS) para la determinación de disruptores endocrinos en varias muestras de interés como el embalaje de palomitas para microondas, el polvo doméstico o el lodo de depuradora. Tras la etapa de extracción, han de realizarse análisis mediante cromatografía de gases (GC) o mediante cromatografía líquida acopladas a espectrometría de masas, dependiendo de las propiedades de los compuestos estudiados. El polvo doméstico y los embalajes de comida son importantes fuentes de exposición a EDCs para los humanos, y el estudio del nivel de contaminación de sedimentos y de lodos de depuradora es muy importante ya que es un indicador de los niveles de contaminación del medio acuático y también porque el lodo puede ser reutilizado como abono en cultivos.

Los objetivos concretos planteados son:

1. Desarrollar, optimizar y validar un método basado en SPLE para la determinación de BDEs en polvo doméstico.
2. Desarrollar, optimizar y validar un método basado en FUSLE para la determinación de BDEs en polvo doméstico.
3. Desarrollar, optimizar y validar un método que emplee MEPS tras la extracción SPLE para la determinación de BDEs en lodo de depuradora.
4. Desarrollar, optimizar y validar un método basado en SPLE para la determinación de APs y BPA en lodo de depuradora.
5. Desarrollar, optimizar y validar un método basado en FUSLE para la determinación de APs y BPA en lodo de depuradora.
6. Desarrollar, optimizar y validar un método para la determinación de PFCs en embalaje de palomitas para microondas, basado en PLE y UPLC-(QTOF)MS.
7. Desarrollar, optimizar y validar un método basado en FUSLE para la determinación de PFCs en lodo de depuradora.
8. Desarrollar, optimizar y validar un método para la determinación de nuevos retardantes de llama no halogenados en sedimentos y lodos.
9. Evaluar las ventajas que aportan las técnicas PLE, SPLE, MEPS y FUSLE respecto a las técnicas de extracción clásicas.

Esta tesis pretende, mediante el desarrollo y optimización de las etapas de extracción PLE, SPLE, FUSLE o MEPS, conseguir importantes mejoras respecto a los métodos de análisis previamente descritos para los problemas analíticos propuestos, aumentando su alcance, automatizando y simplificando el proceso analítico, o disminuyendo el uso de disolventes y el tiempo de análisis.

1

Introducción

1.1. Compuestos disruptores endocrinos (EDCs)

- 1.1.1. Definición y regulación de EDCs
- 1.1.2. Clasificación y emisión de EDCs al medio ambiente
- 1.1.3. Exposición y efectos en la biosfera
- 1.1.4. Exposición en humanos y efectos sobre su salud

1.2. Avances en técnicas de extracción para la determinación de EDCs

- 1.2.1. Extracción selectiva con líquidos presurizados (SPLE)
- 1.2.2. Extracción asistida por ultrasonidos focalizados (FUSLE)
- 1.2.3. Microextracción en fase sólida con sorbentes empaquetados (MEPS)



1. INTRODUCCIÓN

1.1 COMPUESTOS DISRUPTORES ENDOCRINOS (EDCs)

1.1.1. Definición y regulación de EDCs

Los compuestos disruptores endocrinos (Endocrine Disruptor Compounds, EDCs) se definen como sustancias exógenas que causan efectos adversos en organismos sanos o su descendencia, siendo dicho efecto causado por un mecanismo de acción endocrino.

La salud humana y de los animales en libertad depende de su capacidad para reproducirse y desarrollarse con normalidad, y esto no es posible sin un sistema endocrino sano. En los últimos años se ha incrementado la aparición de enfermedades en humanos y alteraciones en los seres vivos relacionadas con la perturbación del sistema endocrino; y estas alteraciones se han relacionado con la exposición a EDCs mediante diversos estudios en laboratorio [1].

La legislación europea ha creado recientemente un criterio para la aprobación de la comercialización y uso de nuevos compuestos químicos basado en su potencialidad como disruptores endocrinos [2, 3]. Además, las sustancias que puedan causar alteraciones en el sistema endocrino han de estar autorizadas por la regulación europea de sustancias químicas (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals, REACH; 1907/2006) [4].

1.1.2. Clasificación y emisión de EDCs al medio ambiente

Los EDCs se pueden clasificar según su persistencia en el medio ambiente y sus propiedades químicas y estructurales, tal como se recoge en la Tabla 1.1.1.

Los contaminantes orgánicos persistentes (Persistent Organic Pollutants (POPs)) son compuestos que se ha demostrado que persisten en el medio ambiente, se bioacumulan, son tóxicos y son susceptibles de ser transportados a grandes distancias.

Tabla 1.1.1. Clasificación y ejemplos de compuestos disruptores endocrinos

Clasificación	Ejemplos de EDCs ¹
Compuestos halogenados persistentes y bioacumulativos	
Persistent Organic Pollutants (POPs) (Convención de Estocolmo)	PCDDs, PCDFs, PCBs, HCB, PFOS, PBDEs, PBBs, Clordano, Mirex, Toxafeno, DDT/DDE, Lindano, Endosulfán
Otros compuestos persistentes y bioacumulativos	HBCDD, SCCP, PFCAs (ej. PFOA), Octacloroestireno, PCB metilsulfonas
Compuestos menos persistentes y menos bioacumulativos	
Plastificantes y otros aditivos para materiales y otros productos	Esteres de ftalato (DEHP, BBP, DBP, DiNP), Trifenil fosfato, Bis(2-etilhexil) adipato, n-Butilbenceno, Triclocarbano, Hidroxianisol butilado
Compuestos policíclicos aromáticos (PACs), PAHs	Benzo(α)pireno, Benzo(α)antraceno, Pireno, Antraceno
Compuestos fenólicos halogenados (HPCs)	2,4-Diclorofenol, Pentaclorofenol, Hidroxi-PCBs, Hidroxi-PBDEs, Tetrabromobisfenol A, 2,4,6-Tribromofenol, Triclosan
Compuestos fenólicos no halogenados (No-HPCs)	Bisfenol A, Bisfenol F, Bisfenol S, Nonilfenol, Octilfenol, Resorcinol

Tabla 1.1.1. cont. Clasificación y ejemplos de compuestos disruptores endocrinos

Clasificación	Ejemplos de EDCs
Pesticidas, medicamentos e ingredientes de productos de cuidado personal	
Pesticidas actualmente en uso	2,4-D, Atracina, Carbaril, Malation, Mancoceb, Vinclozolin, Procloraz, Procimidona, Clorpirifos, Fenitrotión, Linurón
Medicamentos, estimuladores del crecimiento e ingredientes de productos de cuidado personal	Activos endocrinos (Tamoxifeno, Dietilestilbestrol, Etinilestradiol, Levonorgestrel), SSRIs (Fluoxetina), Flutamida, Parabenos, 4-Metilbenciliden alcanfor, Metoxicinamato de octilo, 3-Bencilideno alcanfor, Galaxólido
Otros compuestos	
Compuestos metálicos y organometálicos	Arsénico, Cadmio, Plomo, Mercurio, Metilmercurio, Tributiestañó, Trifenilestaño
Hormonas naturales	17 β -Estradiol, Estrona, Testosterona
Fitoestrógenos	Isoflavonas, Coumestan, Micotoxinas (Zearalanona), Prenilflavonoides

¹ Ver Apéndice I para consulta de abreviaturas y acrónimos

La mayoría de compuestos clasificados como POPs en la Convención de Estocolmo [5] tienen propiedades como disruptores endocrinos. Aunque algunos de los POPs han sido regulados o prohibidos en la mayoría de países hace varias décadas (por ejemplo los PCBs), aún se encuentran altos niveles de contaminación en el medio ambiente debido a su persistencia. Los compuestos incluidos en el grupo “otros compuestos persistentes y bioacumulativos” cumplen algunos de estos criterios, pero no todos ellos.

Se han encontrado altos niveles de concentración de estos dos grupos de contaminantes en especies animales y en humanos, tanto en lugares cercanos a su empleo como en lugares alejados; y en concentraciones mayores en los niveles superiores de la cadena alimentaria (humanos, osos polares, aves de presa, cocodrilos, etc.). Estos compuestos se acumulan en tejidos y fluidos con alto contenido en grasa (leche materna, yema de huevo, grasa de ballena, etc.) y pueden ser transferidos a fetos en desarrollo y crías recién nacidas a través de la placenta y la leche materna, respectivamente.

Otros EDCs son menos persistentes en el medio ambiente, y no se acumulan en los organismos durante periodos prolongados de tiempo. Un ejemplo es el bisfenol A, que es eliminado del organismo en 4-8 horas. Sin embargo, aunque sean menos persistentes, los problemas derivados de una exposición prolongada debido al uso continuado de estos compuestos hacen que su emisión al medio ambiente no sea menos preocupante.

La liberación de los EDCs al medio ambiente, se produce desde el momento de su síntesis y empleo hasta su eliminación como residuos. Los EDCs se emplean para la fabricación de multitud de productos (plásticos, recubrimientos antiadherentes, productos de cuidado personal, etc.). Durante su síntesis y empleo en fábricas se producen emisiones al agua, suelo y atmósfera. Durante la vida de estos productos se puede producir la liberación paulatina de EDCs al medio ambiente, y cuando son desechados se producen emisiones a través de su incineración.

Varios EDCs son usados como pesticidas, medicamentos o en la elaboración de productos de cuidado personal o de limpieza. Los pesticidas usados en la actualidad son formulados de manera que no persistan en el medio ambiente ni se acumulen en suelos u organismos; sin embargo, son de interés debido a las altas concentraciones que se alcanzan en suelos o aguas subterráneas durante su aplicación.

Los medicamentos prescritos para interferir en el sistema endocrino, así como los EDCs usados en la elaboración de productos de cuidado personal, son emitidos al medio ambiente a través de las aguas residuales. Estas aguas residuales son tratadas en las plantas depuradoras, y de éstas se devuelve el agua tratada al medio y se producen lodos que pueden ser eliminados o aplicados en suelos agrícolas como abono. La Figura 1.1. muestra un esquema general de distribución de EDCs en el medio ambiente, donde entran en contacto con los seres vivos.

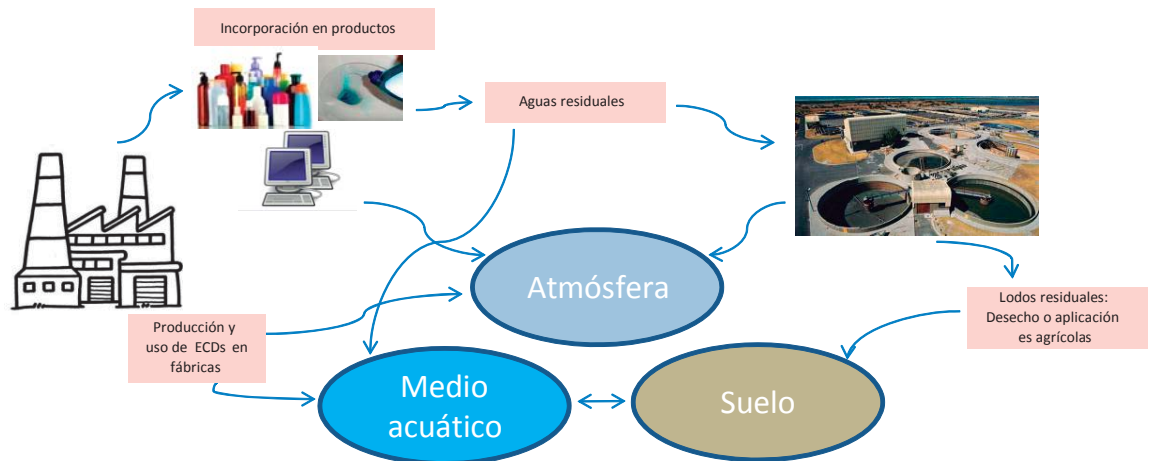


Figura 1.1. Esquema de la liberación de EDCs al medio ambiente.

Otras fuentes de emisión puede ser la lixiviación de campos de cultivo, emisiones de áreas urbanas o transporte vía aérea a ecosistemas alejados del punto de emisión [1].

1.1.3. Exposición y efectos en la biosfera

Como se ha indicado en el apartado anterior, los compuestos disruptores endocrinos son liberados al medio ambiente, a la atmósfera, al medio acuático y al suelo. La exposición de los seres vivos a los EDCs depende de las propiedades y persistencia del compuesto. Mientras algunos compuestos pueden ser rápidamente transformados por la luz solar, las bacterias y ciertos procesos químicos, otros más estables permanecen en el medio durante meses o años. Por lo tanto, la exposición puede variar según el tipo de EDC.

Los seres vivos están expuestos a EDCs a través de la dieta, por inhalación o por absorción a través de la piel; esta exposición se mide a través del análisis de muestras medioambientales (aire, agua, suelo, sedimentos, comida) y mediante análisis de tejidos animales.

Varios tipos de EDCs están presentes en las aguas superficiales, y su concentración varía de un lugar a otro y en el mismo lugar varía con el tiempo. La importancia del

agua como fuente de exposición para los animales depende del tipo de compuesto. Algunos EDCs son más solubles en agua (por ejemplo algunos medicamentos, pesticidas u hormonas) y son encontrados en niveles de partes por trillón (ppt, ng L^{-1}) a partes por billón (ppb, $\mu\text{g L}^{-1}$) en muestras de agua. Los peces toman estos EDCs a través de las branquias, mientras que los mamíferos y las aves los toman a través del agua que beben.

Cuando los EDCs se liberan al medio ambiente, pueden quedar ligados al suelo o a partículas y sedimentos en ríos. Los organismos que viven en el suelo están expuestos a ellos; así los EDCs se bioacumulan en gusanos, caracoles e insectos y son incorporados a la cadena alimentaria. La dieta es una fuente de exposición a EDCs muy importante. Debido a las propiedades de algunos compuestos con alta afinidad por grasas y poca solubilidad en agua se produce su concentración en los organismos y su biomagnificación a través de los eslabones de la cadena alimentaria. Esta concentración-biomagnificación se ha demostrado para varios POPs (PCBs, BDEs, HBCDD) y algunos metales. Así, la concentración en organismos es mayor cuanto más rica en grasa es la dieta y en animales mayores en tamaño y edad [1].

Los EDCs actúan sobre los organismos interfiriendo en el metabolismo hormonal. Dado que las funciones reproductivas están controladas por un equilibrio hormonal, la exposición a EDCs se ha asociado con problemas como reducción de la fecundación, tiempos de concepción más largos o disminución de la movilidad del esperma.

Son numerosos los estudios realizados en animales para evaluar el efecto de los EDCs. Se ha demostrado que la exposición durante el desarrollo de las crías altera el desarrollo de las gónadas, causa una reducción en la calidad del esperma y cambios en el comportamiento sexual como des masculinización y feminización de la descendencia, retraso en la pubertad de hembras y reducción de su fertilidad, etc.

1.1.4. Exposición en humanos y efectos sobre su salud

La mayor fuente de exposición para los humanos a la mayoría de EDCs es la dieta, a través del agua y la comida, especialmente los alimentos grasos. Sin embargo, durante la última década se ha demostrado que los humanos, y en mayor medida

los niños pequeños, están también expuestos a EDCs a través del polvo y partículas de ambientes domésticos como hogares, escuelas, guarderías y oficinas. Estos EDCs son liberados desde materiales y productos en los que se han usado como aditivos: tejidos, muebles, productos electrónicos y eléctricos, etc.

Estamos expuestos a EDCs mediante la inhalación de aire y partículas, el consumo de comida y agua contaminadas o a través de la vía cutánea, por ejemplo, con la aplicación de productos cosméticos. También se han identificado como fuentes de exposición a EDCs la manipulación de residuos electrónicos y el reciclaje de los mismos. La exposición a estos compuestos depende de los hábitos del individuo, así como de la localización de los ambientes de trabajo y residencia.

Los EDCs interfieren en el sistema endocrino del ser humano, alterando los niveles hormonales, inhibiendo o estimulando la producción y metabolismo de hormonas, o modificando su transporte. Esta interferencia puede causar diversos efectos sobre el desarrollo, sistema reproductivo, neurológico, cardiovascular, metabólico o sistema inmune. En la tabla 1.1.2 se muestran diferentes hormonas, su función y algunos ejemplos de los EDCs que pueden alterar su metabolismo [6].

Uno de los efectos más conocidos es el producido sobre la hormona tiroidea, relacionada con varios procesos fisiológicos como la regulación del metabolismo, la regeneración ósea, la función cardíaca y el estado mental. Por esto, la función tiroidea es esencial para el bienestar psicológico y fisiológico. Además, la glándula tiroidea es especialmente importante durante el desarrollo del feto ya que el desarrollo del cerebro es dependiente de los niveles de esta hormona: su ausencia reduce el crecimiento y diferenciación del córtex cerebral, hipocampo y cerebelo. La exposición a EDCs puede alterar comportamientos reproductivos, tener efecto en procesos del desarrollo neuronal e influir en la morfología de circuitos cerebrales [7, 8].

La exposición de adultos a EDCs es perjudicial ya que puede variar la concentración de lípidos en sangre y de enzimas metabólicas necesarias para convertir el colesterol en hormonas. Sin embargo, la exposición a EDCs es más peligrosa si ocurre durante los primeros periodos de la vida, como el intrauterino, perinatal, juventud o la pubertad, ya que es cuando los organismos son más sensibles a los cambios hormonales.

Tabla 1.1.2. Hormonas, funciones hormonales y EDCs que pueden alterarlas

Hormona	Función	EDCs
Andrógeno	Desarrollo sexual masculino	Pesticidas Ftalatos Compuestos polihalogenados
Estrógeno	Desarrollo sexual femenino	Alquilfenoles BPA Dioxinas Furanos Hidrocarburos halogenados Metales pesados
Hormona tiroidea	Metabolismo Ritmo cardíaco	BPA Dioxinas Furanos PBDEs PCBs Percloratos Pesticidas Ftalatos Fitoestrógenos PFCs
Progesterona	Desarrollo sexual femenino	BPA Fungicidas Herbicidas Insecticidas
Glucocorticoide	Desarrollo Metabolismo Respuesta al estrés	Arsénico BPA Ftalatos

La exposición a EDCs en edades tempranas puede estar directamente asociada con el aumento durante los últimos 20 años de enfermedades muy comunes en humanos como asma, alergias, problemas de comportamiento y aprendizaje, pubertad temprana, infertilidad, cáncer de pecho y de próstata, Parkinson, obesidad y otras. En la tabla 1.1.3 se recogen varias enfermedades comunes y los EDCs responsables de su proliferación [6].

Tabla 1.1.3. Enfermedades que pueden ser producidas por diferentes compuestos disruptores endocrinos

Sistema afectado	Enfermedad	EDCs
Reproductivo/endocrino	Cáncer de pecho/próstata Endometriosis Infertilidad Diabetes/síndrome metabólico Pubertad temprana Obesidad	BPA Dioxinas PCBs Estrógenos Pesticidas organoclorados Ftalatos
Inmune/autoinmune	Sensibilidad a infecciones Enfermedad autoinmune	Dioxinas
Pulmón-cardiovascular	Asma Afecciones cardiovasculares	BPA PCBs
Cerebral/nervioso	Alzheimer Parkinson Dificultad comportamiento/aprendizaje	Plomo Pesticidas organoclorados PCBs

En este trabajo se tratarán con mayor profundidad los compuestos disruptores endocrinos que han sido analizados a lo largo del desarrollo de ésta tesis: PBDEs, APs, BPA, PFCs y OPFRs y se detallarán los nuevos métodos desarrollados para la determinación de estos contaminantes en diferentes matrices. Las técnicas en las que se basan estos métodos, PLE, SPLE, FUSLE y MEPS, proporcionan mejoras frente a los métodos desarrollados anteriormente con el mismo propósito, basados en técnicas clásicas de análisis, que normalmente conllevan procesos de análisis más laboriosos y complejos, un gasto elevado de disolventes y un prolongado tiempo de análisis.

1.2. AVANCES EN TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE EDCs

Dada la toxicidad de los EDCs y su dispersión en el medio ambiente, durante los últimos años se han realizado numerosos trabajos encaminados a conocer sus efectos sobre la salud y el medio ambiente. Para ello se han desarrollado métodos de análisis que permitan determinar EDCs en diferentes tipos de muestras biológicas y medioambientales.

Las técnicas clásicas de tratamiento de muestras emplean, por lo general, grandes cantidades de disolvente y requieren tiempos de análisis largos. Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas encaminadas a conseguir métodos más rápidos, automatizados, que empleen menos cantidad de disolvente, que resulten más económicos y que cuiden el medio ambiente al generar menos residuos.

Con estos objetivos, en esta tesis se han empleado las siguientes técnicas de extracción: extracción con líquidos presurizados (PLE), extracción selectiva con líquidos presurizados (SPLE), extracción asistida por ultrasonidos focalizados (FUSLE) y microextracción asistida por sorbentes empaquetados (MEPS).

La extracción selectiva con líquidos presurizados consiste en la realización simultánea de la extracción PLE de la muestra y la limpieza del extracto en la celda, evitando de esta manera tener que realizar una etapa posterior de limpieza como SPE o GPC, y reduciendo de este modo el tiempo de análisis y el consumo de disolventes.

La extracción asistida por ultrasonidos focalizados se basa en aumentar la eficacia de la extracción asistida por ultrasonidos mediante la inserción de una sonda en el disolvente de extracción en contacto con la muestra sólida. Así se consigue disminuir el tiempo de análisis de horas a segundos.

Por último, la extracción asistida con sorbentes empaquetados consiste en la miniaturización de la extracción en fase sólida (SPE), disminuyendo el consumo de disolventes y realizándola de forma automática y acoplada en línea con la cromatografía de gases.

1.2.1. Extracción selectiva con líquidos presurizados (SPLE)

La extracción con líquidos presurizados (PLE) fue desarrollada a finales de los años 90 como alternativa a las técnicas de extracción clásicas como extracción sólido-líquido (SLE), Soxhlet o ultrasonidos. En PLE, la muestra es introducida en la celda de extracción, normalmente mezclada con un material inerte (arena, óxido de aluminio, sulfato de sodio, tierra de diatomeas, etc.) para evitar agregados en la muestra y permitir una mayor superficie de exposición al disolvente.

La presurización de la celda en la que se dispone la muestra permite el empleo de disolventes orgánicos a altas temperaturas, por encima de su punto de ebullición, y esto supone un aumento en la eficacia de la extracción que proporciona resultados comparables a las técnicas clásicas [9-13] pero con menores tiempos de extracción.

Dada la eficacia de la técnica PLE, normalmente los analitos se extraen junto a otros muchos compuestos que pueden interferir en su determinación. Tradicionalmente se han empleado técnicas de separación como GPC o SPE para eliminar estas interferencias de los extractos. Esta etapa de limpieza se puede evitar incluyendo un sorbente en la celda, de modo que se realice simultáneamente la extracción y la limpieza del extracto, en una misma etapa. Esta estrategia se denomina extracción selectiva con disolventes presurizados (SPLE).

El material sorbente empleado puede ser de diferentes tipos, según las interferencias que se quieran eliminar. La tabla 1.2.1. muestra una lista de diferentes sorbentes y el objetivo de los mismos.

El material sorbente puede ser incluido en la celda dispersado con la muestra y el desecante (de forma similar a la dispersión de matriz en fase sólida (MSPD)) o como un lecho después de la capa de muestra (de forma similar a la extracción en fase sólida (SPE)). En la figura 1.2.1 se muestra un ejemplo de llenado de la celda para realizar SPLE.

La SPLE ha sido usada en numerosas aplicaciones. En la tabla 1.2.2. se enumeran varios ejemplos de los analitos y matrices estudiadas, con sus referencias.

Durante el desarrollo de métodos PLE, se han de tener en cuenta varios factores que influyen en la extracción, como son el disolvente, la temperatura, el tiempo y los ciclos de extracción. Además, si se requiere, se puede realizar una etapa previa de limpieza con condiciones suaves de extracción para eliminar ciertas

interferencias. En el caso de realizar SPLE, otros factores que han de tenerse en cuenta son el tamaño de muestra, el tipo y la cantidad de sorbente que se incluirá en la celda y la distribución de la misma.

Tabla 1.2.1. Diferentes materiales sorbentes y usos

Sorbente	Uso
Carbono	Retiene compuestos orgánicos no polares
Cobre	Retiene azufre
Resinas de intercambio iónico	Retiene interferencias iónicas para el posterior análisis por intercambio iónico
Sílice acidificada	Retiene lípidos y degrada la materia orgánica
Alúmina	Retiene lípidos no polares y colorantes
Florisil	Retiene lípidos no polares
Gel de sílice	Retiene lípidos no polares

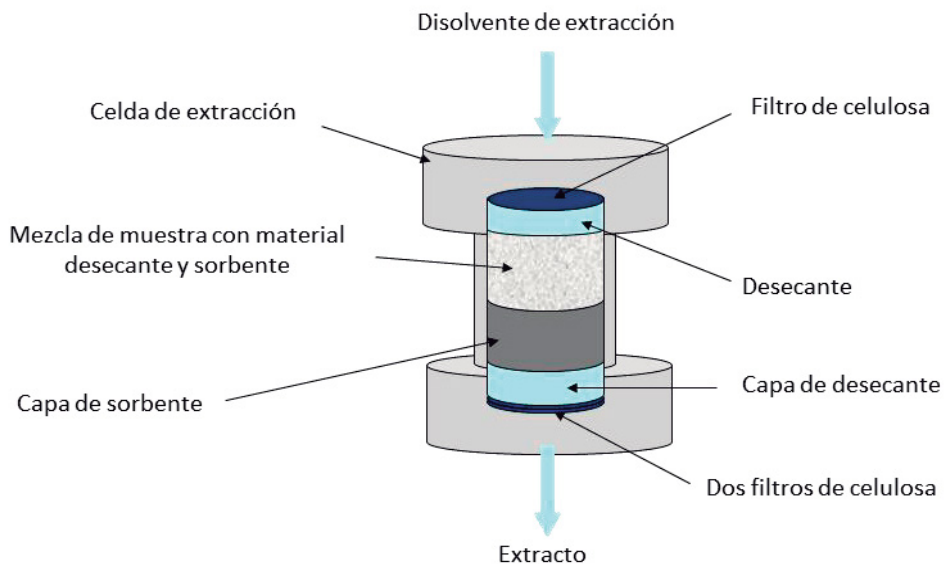


Figura 1.2.1. Distribución de la celda de extracción para SPLE

Tabla 1.1.2. Ejemplos de aplicaciones basadas en SPLE

Muestra	Analitos	Sorbente	Ref.
Alimentos	Dioxinas	Carbono	[14]
	PCBs	Sílice acidificada	[15, 16]
	Sulfamidas	C18	[17]
Biota	PCBs	Florisil	[18]
	Lípidos	Sílice	[19]
Pescado	PCBs	Sílice acidificada	[20]
	PBBs	Sílice acidificada	[21]
	Pesticidas, PCBs y PBDEs	Florisil	[22]
Cera de ballena	Pesticidas, PCBs y PBDEs	Alúmina, sílice y Florisil	[23]
Algas	Pesticidas	Florisil	[24]
Moluscos	APs y BPA	Alúmina	[25]
Hígado	PBDEs y PCBs	Sílice acidificada	[26]
	PCBs y metabolitos	Florisil	[27]
Corcho	Haloanisoles	Gel de sílice	[28]
Suelo	Pesticidas organoclorados	Florisil	[29]
	Estronas y BPA	Sílice	[30]
	PCDDs y PCDFs	Sílice acidificada	[31]
Polvo	Esteres organofosforados	Alúmina	[32]
	PBDEs	Florisil	[33]
Lodo	APs y BPA	Florisil	[34]

1.2.2. Extracción asistida por ultrasonidos focalizados (FUSLE)

La extracción asistida por ultrasonidos es una técnica muy usada en química analítica. Hay dos maneras de emplear los ultrasonidos: directamente en la muestra o indirectamente a través de las paredes del recipiente que la contiene. La exposición indirecta se realiza con un baño de ultrasonidos como el que se puede encontrar en la mayoría de laboratorios. Las ondas de ultrasonidos primero han de recorrer el líquido del baño y cruzar la pared del recipiente de la muestra para llegar a ella. Por esto, la intensidad de las ondas en la muestra es menor de lo esperado y las aplicaciones analíticas parecían limitadas por la potencia que podían suministrar los baños de ultrasonidos.

La extracción asistida por ultrasonidos focalizados (FUSLE) consiste en la aplicación directa de las ondas de ultrasonidos en el disolvente, mediante la inmersión de parte de una sonda en el mismo. Esta sonda, que normalmente está fabricada de una aleación de titanio, es resistente a altas temperaturas y a la corrosión, y puede emitir una potencia hasta 100 veces mayor que la que suministra un baño de ultrasonidos. En la figura 1.2.1. se muestra el equipo SONOPLUS usado en los trabajos recogidos en esta tesis. Este equipo consta de un generador, un convertidor de ultrasonidos, una antena y una sonda. En la foto que se muestra el equipo está dotado de una cámara de insonorización.



Figura 1.2.1. Equipo SONOPLUS 2070

Los ultrasonidos se transmiten a través del medio mediante ondas que comprimen y extienden el espacio entre las moléculas. Cuando la presión negativa causada por una onda ultrasónica es lo suficientemente grande, la distancia entre las moléculas de disolvente es suficiente como para crear un vacío, llamado burbuja cavitacional. Si la intensidad es baja ($1-3 \text{ W cm}^{-2}$) las burbujas cavitacionales se mantienen oscilando en un mismo tamaño durante varios ciclos acústicos. Si las burbujas son formadas por altas intensidades, mayores de 10 W cm^{-2} , se produce una cavitación transitoria en la que tras unos pocos ciclos la burbuja ha duplicado su tamaño, para terminar comprimiéndose y colapsando violentamente. Este fenómeno se considera el principal responsable de los efectos físico-químicos de la energía ultrasónica. Cada burbuja que colapsa puede ser considerada como un microrreactor en el cual se alcanzan instantáneamente temperaturas de miles de grados centígrados y presiones de más de mil atmósferas.

La cavitación de las burbujas es muy interesante para los objetivos perseguidos en Química Analítica. Si un sólido está presente, el tamaño de partícula es disminuido mediante su ruptura, y por lo tanto la superficie en contacto con el disolvente es mayor. En este trabajo hemos empleado esta técnica para realizar extracciones sólido-líquido, pero también se pueden aplicar los ultrasonidos focalizados en análisis elemental y de especiación, para acelerar reacciones, para extracciones líquido-líquido, etc. En la tabla 1.2.1. se muestran varias referencias en las que se ha usado FUSLE como técnica de extracción de compuestos orgánicos en muestras sólidas.

El aumento de la amplitud de las ondas ultrasónicas implica un aumento de la temperatura de la muestra, por lo que se ha de controlar la misma para evitar la evaporación del disolvente, la degradación de los compuestos o la volatilización de los mismos. El control de la temperatura es también importante para la efectividad del FUSLE, ya que si aumenta la temperatura las características físicas del disolvente cambian, la transmisión de las ondas puede ser afectada y no producirse la cavitación. Para controlar la temperatura, se puede realizar la extracción en un baño de hielo, usar recipientes especiales para disipar el calor o irradiar mediante pulsos de ultrasonidos [35].

Para el desarrollo de métodos basados en FUSLE, hay que estudiar varios factores como son la naturaleza y el volumen del disolvente de extracción, el tiempo de sonicación, la potencia y la cantidad de muestra.

Tabla 1.2.3. Muestras y analitos para los que se ha usado FUSLE

Muestra	Analitos	Ref.
Pescado	PFCs	[36]
	APs, 17 β -estradiol	[37]
Vegetales	PFCs	[36]
	PBDEs	[38]
Suelo	PFCs	[36]
	PBDEs	[38]
Embalajes	PFCs	[39]
	Filtros ultravioleta	[40]
	BPA, BPF, BADGE, BPDGE	[41]
Polvo	PBDEs	[42]
Lodo	PFCs	[43]
	BPA y APs	[34]
Sedimentos	PAHs, PCBs, PEs, NPs	[44]
	PAHs	[45]
Riñón	Proteínas	[46]

1.2.3. Microextracción en fase sólida con sorbentes empaquetados (MEPS)

La técnica MEPS fue desarrollada en 2004 por Abdel-Rehim [47, 48]. Se basa en la miniaturización de SPE. En ella, una pequeña cantidad de sorbente (1-4 mg) es empaquetada en el interior de un cartucho (BIN), que se sitúa en la parte superior de una aguja que forma parte de una jeringa (Fig. 1.2.2). A través de esta aguja, se hace pasar la muestra repetidas veces, de manera que los analitos quedan retenidos en el material. Después se puede realizar la limpieza del cartucho pasando disolvente a través del mismo. Finalmente se eluyen los compuestos con una pequeña cantidad de disolvente, normalmente compatible con la técnica cromatográfica a emplear y se inyecta en el sistema al que se encuentre acoplado (electroforesis capilar, cromatografía de gases o cromatografía de líquidos).

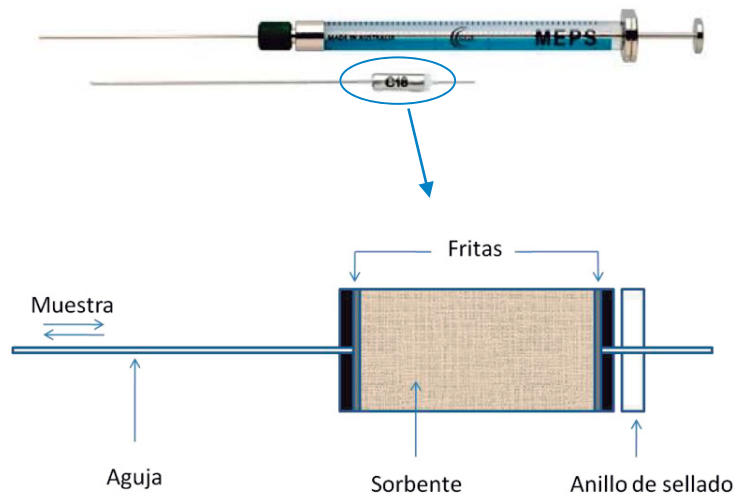


Figura 1.2.2. Jeringa para MEPS y BIN

Hay diversos tipos de sorbente, entre los cuales se puede seleccionar el más adecuado según los analitos a determinar. La variedad de sorbentes es cada vez mayor, y abarca desde los más comunes en SPE: C18 y sílice, hasta los polímeros de impronta molecular (MIPS), específicos para un tipo de compuestos. Otros sorbentes disponibles para desarrollar aplicaciones MEPS son C2, C8, APS (*amino propyl silane*) PGC (*porous graphitic carbon*) y PEP (*polar enhanced polymer*).

Esta técnica es muy interesante, ya que se consigue tanto la limpieza de la muestra como la preconcentración de los analitos, consiguiendo mejorar la sensibilidad del método. Desde que se desarrolló ha sido usado principalmente en bioanálisis, ya que es adecuada para pequeñas cantidades de muestra, lo que supone una importante ventaja en análisis clínico. Se han desarrollado muchos métodos para el análisis de medicamentos para cáncer, anestésicos, neurotransmisores, antibióticos, drogas de abuso, etc. en sangre, orina y plasma [49, 50].

En los últimos años, se ha ampliado el alcance de MEPS (tabla 1.2.4) ya que se ha empleado en el desarrollo de varias aplicaciones para análisis de aguas y otras matrices como textiles y vino.

Tabla 1.2.4. Métodos basados en MEPS para análisis de muestras no biológicas

Matriz	Analitos	Sorbente	Ref.
Agua	Ácidos haloacéticos	C18	[51]
	Estrógenos	MIP	[52]
	Fluoroquinolona	MIP	[53]
	POPs	C18	[54]
	PAHs	C8	[55]
	NSAIDs	C18	[56]
	Parabenos y triclosan	C18	[57]
	Filtros UV	C18	[58]
Textiles	Aminas aromáticas	Polímero polar	[59]
Vino	Haloanisoles	C18	[60]
	Compuestos fenólicos	C8	[61]

Para el desarrollo de métodos basados en MEPS hay que tener en cuenta varios factores. Es necesario optimizar la etapa de retención de los analitos en el cartucho, teniendo en cuenta el número de veces que la muestra pasa por el cartucho, la velocidad a la que pasa y el volumen y naturaleza de disolvente. También hay que estudiar la etapa de lavado del cartucho, evaluando el número de etapas y la naturaleza del disolvente de lavado y el secado del mismo pasando un volumen de aire varias veces. En la etapa de elución, se estudian factores como el número de etapas de elución, el tipo y el volumen de disolvente de elución (compatible con la técnica que siga a la MEPS) y la velocidad de elución y de inyección si procede. Dado que los cartuchos se reutilizan es muy importante la limpieza posterior a la elución, y ha de comprobarse la ausencia de contaminación cruzada para asegurar que no se produce efecto memoria.

Con el empleo de la MEPS se reduce el volumen de disolventes empleados, ya que las cantidades empleadas son muy pequeñas (la capacidad total de la jeringa puede ser de 5 μL a 1 mL, aunque se suelen usar de 100 ó 250 μL). El cartucho se puede reutilizar más de 100 veces (dependiendo del tipo de muestra), lo que junto con el ahorro de disolvente representa una importante reducción de costes respecto a SPE. Además, si se dispone de un automuestreador adecuado se puede automatizar completamente el proceso MEPS de preparación de la muestra con la técnica cromatográfica requerida, acortando considerablemente los tiempos de análisis y simplificando el proceso.

2

Éteres de Difenilo Bromados (BDEs)

- 2.1. Estructura, propiedades y usos de los BDEs
- 2.2. Toxicidad de los BDEs
- 2.3. Acumulación en el medio ambiente y exposición a BDEs
- 2.4. Determinación de BDEs en diferentes tipos de muestras
- 2.5. Nuevos métodos para la determinación de BDEs en polvo doméstico y lodo de depuradora



2. ÉTERES DE DIFENILO BROMADOS (BDEs)

Los éteres de difenilo bromados (BDEs o PBDEs) han sido usados desde los años 70 como aditivos retardantes de llama en la industria de numerosos productos, como por ejemplo equipos electrónicos, plásticos, pinturas, textiles sintéticos, etc. En la mayoría de los casos, estos aditivos no están químicamente unidos al material por lo que con el paso del tiempo pueden ser liberados al medio ambiente.

2.1 Estructura, propiedades y usos de los BDEs

La estructura general de los éteres de difenilo bromados se muestra en la figura 1.2.1. Existen 209 congéneres de BDEs, según el número de bromos y la posición de los mismos en el compuesto. La numeración se realiza de acuerdo con el sistema IUPAC para PCBs, como se muestra en la tabla 2.1.

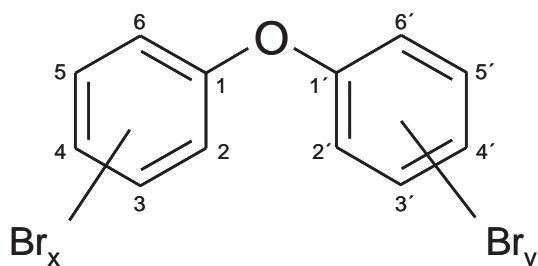


Figura 1.2.1. Estructura química general de los BDEs ($x + y = 1-10$)

Los BDEs tienen bajas presiones de vapor y son muy lipofílicos, con coeficientes octanol-agua desde 5.87 hasta 9.97 para mono-BDE y deca-BDE, respectivamente. Las propiedades físico-químicas difieren según el grado de bromación, por lo que se comportan de manera diferente en el medio ambiente [62]. La presión de vapor decrece conforme aumenta el grado de bromación, y se ve aumentada para los congéneres con sustituyentes en las posiciones orto. Su alta persistencia y baja

solubilidad en agua hace que sean muy propensos a acumularse en sedimentos, polvo, etc. [63]

En la práctica no todos los congéneres son empleados comercialmente. Hay tres mezclas comerciales producidas mayoritariamente: la mezcla penta-BDE, octa-BDE y deca-BDE.

La mezcla deca-BDE contiene aproximadamente un 98% de BDE-209 (deca-BDE) y un 2% de nona-BDEs; la mezcla octaBDE está formada por un 10% de hexa-BDEs, un 40% de hepta-BDEs, un 30% de octa-BDEs y el resto nona-BDEs y deca-BDE; y la mezcla pentaBDE está compuesta por alrededor de un 40% de tetra-BDEs, un 45% de penta-BDEs y el resto es hexa-BDEs. Los congéneres que aparecen con mayor frecuencia en estas mezclas son el BDE-47, el BDE-99, el BDE-100, el BDE-153 y el BDE-154 para la mezcla pentaBDE; el BDE-183, el BDE-197, el BDE-196 y el BDE-207 para la mezcla octaBDE y el BDE-209 y el BDE-206 para la mezcla decaBDE. La mezcla pentaBDE ha sido usada como aditivo en la producción de espuma de poliuretano destinado a la fabricación de sofás, sillas, asientos de automóviles, etc. La mezcla octaBDE se añade a plásticos destinados a circuitos eléctricos, y la mezcla decaBDE se emplea en carcasas de televisores y ordenadores, y en textiles. En los últimos años se han incrementado las restricciones en cuanto a la producción y uso de los BDEs debido a su presencia en el medio ambiente y a su toxicidad. La producción y el empleo de las mezclas de BDEs ha sido prohibida en Europa, y las mezclas pentaBDE y octaBDE han sido prohibidas en Norte América. La mezcla deca-BDE es producida y usada en varios países. No obstante, desde abril de 2008 la Unión Europea ha prohibido su empleo en la fabricación de productos electrónicos y desde enero de 2008 el Estado de Maine (EEUU) lo ha prohibido en muebles [64]. La mezcla decaBDE constituyó aproximadamente el 80% de la demanda mundial de BDEs, la cual en 2001 ascendió a 56.100 toneladas (BSEF, 2003). En Asia no existe restricción alguna en la producción y el uso de BDEs: en China se estima que la producción de deca-BDE en 2006 ascendió a 20.000 toneladas [65].

Tabla 2.1. Nomenclatura IUPAC de BDEs

	BDE-	Sustitución		BDE-	Sustitución	
Mono-BDE	1	2	Tri-BDE	28	2,4,4'	
	2	3		29	2,4,5	
	3	4		30	2,4,6	
Di-BDE	4	2,2'		31	2,4',5	
	5	2,3		32	2,4',6	
	6	2,3'		33	2',3,4	
	7	2,4		34	2',3,5	
	8	2,4'		35	3,3',4	
	9	2,5		36	3,3',5	
	10	2,6		37	3,4,4'	
	11	3,3'		38	3,4,5	
	12	3,4		39	3,4',5	
	13	3,4'		Tetra-BDE	40	2,2',3,3'
	14	3,5			41	2,2',3,4
	15	4,4'			42	2,2',3,4'
Tri-BDE	16	2,2',3	43		2,2',3,5	
	17	2,2',4	44		2,2,3,5'	
	18	2,2',5	45		2,2',3,6	
	19	2,2',6	46		2,2',3,6'	
	20	2,3,3'	47		2,2',4,4'	
	21	2,3,4	48		2,2',4,5	
	22	2,3,4	49		2,2',4,5'	
	23	2,3,5	50		2,2',4,6	
	24	2,3,6	51		2,2',4,6'	
	25	2,3',4	52		2,2',5,5'	
	26	2,3',5	53		2,2',5,6'	
	27	2,3',6	54	2,2',6,6'		

Tabla 2.1. Nomenclatura IUPAC de BDEs

	BDE-	Sustitución		BDE-	Sustitución
Tetra-BDE	55	2,3,3',4	Penta-BDE	82	2,2',3,3',4
	56	2,3,3',4'		83	2,2',3,3',5
	57	2,3,3',5		84	2,2',3,3',6
	58	2,3,3',5'		85	2,2',3,4,4'
	59	2,3,3',6		86	2,2',3,4,5
	60	2,3,4,4'		87	2,2',3,4,5'
	61	2,3,4,5		88	2,2',3,4,6
	62	2,3,4,6		89	2,2',3,4,6'
	63	2,3,4',5		90	2,2',3,4',5
	64	2,3,4',6		91	2,2',3,4',6
	65	2,3,5,6		92	2,2',3,5,5'
	66	2,3',4,4'		93	2,2',3,5,6
	67	2,3',4,5		94	2,2',3,5,6'
	68	2,3',4,5'		95	2,2',3,5',6
	69	2,3',4,6		96	2,2',3,6,6'
	70	2,3',4',5		97	2,2',3',4,5
	71	2,3,4',6		98	2,2',3,4,6
	72	2,3',5,5'		99	2,2',4,4',5
	73	2,3',5',6		100	2,2',4,4',6
	74	2,4,4',5		101	2,2',4,5,5'
75	2,4,4',6	102	2,2',4,5,6'		
76	2',3,4,5	103	2,2',4,5',6		
77	3,3',4,4'	104	2,2',4,6,6'		
78	3,3',4,5	105	2,3,3',4,4'		
79	3,3',4,5'	106	2,3,3',4,5		
80	3,3',5,5'	107	2,3,3',4',5		
81	3,4,4',5	108	2,3,3',4,5'		

Tabla 2.1. Nomenclatura IUPAC de BDEs

	BDE-	Sustitución		BDE-	Sustitución
Penta-BDE	109	2,3,3',4,6	Hexa-BDE	136	2,2',3,3',6,6'
	110	2,3,3',4',6		137	2,2',3,4,4',5
	111	2,3,3',5,5'		138	2,2,3,4,4',5'
	112	2,3,3',5,6		139	2,2',3,4,4',6
	113	2,3,3',5',6		140	2,2',3,4,4',6'
	114	2,3,4,4',5		141	2,2',3,4,5,5'
	115	2,3,4,4',6		142	2,2',3,4,5,6
	116	2,3,4,5,6		143	2,2',3,4,5,6'
	117	2,3,4',5,6		144	2,2',3,4,5,6'
	118	2,3',4,4',5		145	2,2',3,4,6,6'
	119	2,3,4,4',6		146	2,2',3,4',5,5'
	120	2,3',4,5,5'		147	2,2',3,4',5,6
	121	2,3',4,5',6		148	2,2',3,4,5,6'
	122	2',3,3',4,5		149	2,2',3,4',5',6
	123	2',3,4,4',5		150	2,2',3,4',6,6'
	124	2',3,4,5,5'		151	2,2',3,5,5',6
	125	2',3,4,5,6'		152	2,2',3,5,6,6
126	3,3',4,4',5	153	2,2',4,4',5,5'		
127	3,3',4,5,5'	154	2,2',4,4',5,6'		
Hexa-BDE	128	2,2',3,3',4,4'	155	2,2',4,4',6,6'	
	129	2,2',3,3',4,5	156	2,3,3',4,4',5	
	130	2,2',3,3',4,5'	157	2,3,3',4,4',5'	
	131	2,2',3,3',4,6	158	2,3,3',4,4',6	
	132	2,2',3,3',4,6'	159	2,3,3',4,5,5'	
	133	2,2',3,3',5,5'	160	2,3,4',4,5,6	
	134	2,2',3,3',5,6	161	2,3,3',4,5',6	
	135	2,2',3,3',5,6'	162	2,3,3',4',5,5'	

Tabla 2.1. Nomenclatura IUPAC de BDEs

	BDE-	Sustitución		BDE-	Sustitución
Hexa-BDE	163	2,3,3',4',5,6	Hepta-BDE	187	2,2',3,4',5,5',6
	164	2,3,3',4',5',6		188	2,2',3,4',5,6,6'
	165	2,3,3',5,5',6		189	2,3,3',4,4',5,5'
	166	2,3,4,4',5,6		190	2,3,3',4,4',5,6
	167	2,3',4,4',5,5'		191	2,3,3',4,4',5',6
	168	2,3',4,4',5',6		192	2,3,3',4,5,5',6
	169	3,3',4,4',5,5'		193	2,3,3',4',5,5',6
Hepta-BDE	170	2,2',3,3',4,4',5	Octa-BDE	194	2,2',3,3',4,4',5,5'
	171	2,2',3,3',4,4',6		195	2,2',3,3',4,4',5,6
	172	2,2',3,3',4,5,5'		196	2,2',3,3',4,4',5',6
	173	2,2',3,3',4,5,6		197	2,2',3,3',4,4',6,6'
	174	2,2',3,3',4,5,6'		198	2,2',3,3',4,5,5',6
	175	2,2',3,3',4,5',6		199	2,2,3,3',4',5,5',6
	176	2,2',3,3',4,6,6'		200	2,2',3,3',4,5,6,6'
	177	2,2',3,3',4',5,6		201	2,2',3,3',4,5',6,6'
	178	2,2',3,3',5,5',6		202	2,2',3,3',5,5',6,6'
	179	2,2',3,3',5,6,6'		203	2,2',3,4,4',5,5',6
	180	2,2',3,4,4',5,5'	204	2,2',3,4,4',5,6,6'	
	181	2,2',3,4,4',5,6	205	2,3,3',4,4',5,5',6'	
	182	2,2',3,4,4',5,6'	Nona-BDE	206	2,2',3,3',4,4',5,5',6
	183	2,2',3,4,4',5',6		207	2,2',3,3',4,4',5,6,6'
	184	2,2',3,4,4',6,6'		208	2,2',3,3',4,5,5',6,6'
	185	2,2',3,4,5,5',6	Deca-BDE	209	2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'
	186	2,2',3,4,5,6,6'			

2.2. Toxicidad de los BDEs

Los congéneres desde tri- a hexa-bromados han sido propuestos como POPs (Persistent Organic Pollutants) al reunir las características consideradas descritas en la convención de Estocolmo en cuanto a bioacumulación, toxicidad y persistencia en el medio ambiente. La estructura de los BDEs es similar a la de compuestos con conocidos efectos tóxicos, como los bifenilos policlorados (PCBs) y los bifenilos polibromados (PBBs). Mientras que los niveles de PCBs y otros compuestos clorados en biota han ido disminuyendo en las últimas décadas, los niveles de BDEs han aumentado [66]. Por estas razones en los últimos años se ha incrementado el interés a cerca de los niveles de contaminación debida a BDEs, y se han realizado numerosos estudios encaminados a determinar los niveles en muestras biológicas y medioambientales así como estudios de su toxicidad en animales.

Los resultados obtenidos en estudios de toxicidad en animales muestran que la exposición pre- y postnatal a estos compuestos puede causar alteraciones en la actividad motora, siendo el principal efecto la hiperactividad, y en la actividad cognitiva, reduciendo la capacidad de aprendizaje y la memoria. Se han planteado dos modelos de acción no excluyentes para la actividad de los BDEs: los efectos sobre la autorregulación de la hormona tiroidea y los efectos directos sobre neuronas y/o células gliales [66-71].

Hay también indicios de efectos de los BDEs sobre el comportamiento de hormonas sexuales, favoreciendo un determinado sexo de las crías y alterando los niveles de estradiol y testosterona en adultos. También se ha demostrado que la exposición a BDEs puede causar problemas reproductivos y de desarrollo [72] y en el sistema nervioso central [73, 74], actuar como disruptores endocrinos [71], y tener actividad cancerígena [75].

No todos los congéneres presentan la misma toxicidad. El BDE-209 es pobremente absorbido por los organismos, eliminado rápidamente (15 días frente a 11.7 años para el BDE-153); y al no bioacumularse es uno de los congéneres menos bioactivo [76]. No obstante, recientemente está aumentando el interés en la mezcla deca-BDE debido a la tendencia del compuesto BDE-209 a degradarse fotolíticamente generando los congéneres con menor grado de bromación.

Los BDEs de menor peso molecular, de tri- a hexa- bromados, son prácticamente absorbidos en su totalidad y lentamente eliminados del organismo con vidas medias de 2 a 12 años, y por lo tanto más peligrosos para la salud [75]. Cinco tetra- penta- y hexa-BDE congéneres (BDE-47, -99, -100, -153 y -154) predominan en los tejidos biológicos, representando el 90% de la concentración total de BDEs en el cuerpo humano [76, 77].

Debido a las evidencias de su toxicidad se han estudiado las concentraciones de BDEs en diferentes tipos de muestras humanas, como tejido adiposo, hígado [78], suero [79-82], orina [83] leche materna [84, 85] y pelo [86].

2.3. Acumulación en el medio ambiente y exposición a BDEs

Los BDEs están incluidos en la lista de contaminantes propuesta por el Parlamento Europeo en la norma 2008/105/EC, donde se indican los compuestos a ser monitorizados en aguas superficiales y prohibida su emisión al medio ambiente. Los niveles máximos para los BDEs 28, 47, 99, 100, 153, y 154, en aguas superficiales son de 0.5 ng L^{-1} .

Se han realizado estudios de los niveles de estos compuestos en varias matrices medioambientales, como son sedimentos, lodo, atmósfera, polvo doméstico, tierras, aguas, etc. De éstas, la principal fuente de exposición para los humanos a BDEs es el polvo doméstico; y en cuanto al medio ambiente, el lodo de depuradora constituye una importante fuente de información acerca de los niveles de BDEs en el medio.

Uno de los principales puntos de recolección y liberación de contaminantes orgánicos en el medio ambiente son las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR), donde se recogen contaminantes provenientes de agua doméstica, de hospitales, emisiones industriales, etc. Debido a su carácter hidrofóbico los BDEs se acumulan en el lodo durante el tratamiento de aguas. Por lo tanto, el lodo es una importante fuente de acumulación y posterior re-emisión de BDEs al medio ambiente. En España se reutiliza un 54% del lodo en tareas agrícolas, lo que implica la exposición de los cultivos y tierras a los contaminantes que hayan sido acumulados en el lodo durante el tratamiento de aguas, y debido a su persistencia en el medio ambiente los BDEs se acumulan en los suelos en los que se ha empleado el lodo como abono [87].

En la tabla 2.2. se muestran los niveles de BDEs en lodo de diferentes localizaciones. El compuesto deca-BDE es el más abundante, y los congéneres que se encuentran más frecuentemente son BDE-47, BDE-99 y BDE-100 [88-91].

Tabla 2.2. Niveles de BDEs en lodos de diferentes localizaciones

Localización	Σ BDEs, ng g ⁻¹	Congéneres, BDE-	Ref.
España	20.7-2326	28, 47, 99, 100, 153, 154, 183, 209	[89]
	197-1185	47, 99, 100, 154, 153, 183, 196, 206, 207, 208, 209	[87]
	16.2 - 45.6	3, 10, 28, 47, 99, 100, 154	[92]
Méjico	n.d.-1303	17, 28, 47, 49, 71, 77, 85, 99, 100, 153, 154	[88]
Australia	4.5-4230	17, 28, 33, 30, 47, 49, 66, 71, 77, 85, 99, 100, 119, 126, 138, 166, 139, 140, 153, 154, 156, 169, 171, 180, 183, 184, 191, 196, 197, 201, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209	[90]
Suiza	138-617	28, 47, 49, 66, 85, 99, 100, 119, 138, 153, 154, 183, 209	[93]
Suecia	18-260	47, 99, 100, 153, 154	[91]
	5.6-1000	209	
Estados Unidos	1918-2086	47, 99, 100, 153, 154	[94]
	1010-1440	209	
	1100-2290	47, 99, 100, 153, 154	[95]
	85-4890	209	

En el caso de la exposición a BDEs para los humanos, a través de varios estudios se ha demostrado que la dieta y el polvo doméstico son las mayores fuentes de exposición. El polvo doméstico es una importante fuente de exposición a BDEs, sobre todo para niños en torno a 1-2 años, debido a que actúa como almacén de BDEs y otros compuestos orgánicos que migran de las superficies de muebles, aparatos electrónicos, etc. [66, 96-101].

En la tabla 2.3 se muestran los niveles de BDEs encontrados en polvo doméstico en diferentes localizaciones. Estos niveles varían según la zona estudiada, encontrando concentraciones totales de BDEs (excluyendo el deca-BDE) desde los 4 ng g⁻¹ medidos en Bélgica hasta 14000 ng g⁻¹ en Estados Unidos. También hay una gran variación en las concentraciones de las muestras de un mismo lugar. Así, las muestras de polvo doméstico analizadas en Singapur presentan valores totales de BDEs desde 11 ng g⁻¹ hasta 12000 ng g⁻¹. En varios estudios el compuesto BDE-209 (deca-BDE) se analiza independientemente del resto de BDEs, ya que es el que presenta mayores concentraciones debido a que es el más empleado comercialmente. Se han determinado valores de deca-BDE en polvo doméstico desde <5 ng g⁻¹ en Bélgica hasta 520 µg g⁻¹ en Reino Unido. Sin embargo, el BDE-209 es degradado fotolíticamente por la luz solar dando lugar a congéneres de menor grado de bromación (de tri- a hexa- bromados), y éstos son los que se encuentran con mayor frecuencia en muestras medioambientales y humanas.

Se estima que el polvo doméstico representa alrededor del 80-93% de la exposición a BDEs. Para los niños, otra fuente importante de exposición a BDEs es la leche materna. Los niveles de estos compuestos en la leche materna se han incrementado en las últimas décadas, así como los niveles en suero, siendo mayores en América del Norte que en Europa, Asia o Australia. Un niño puede llegar a ingerir 100 mg/día de polvo doméstico, frente a los 50 mg/día correspondientes a un adulto. Este factor unido a la diferencia de masa corporal y la contribución de la leche materna hacen que los niños presenten las mayores concentraciones de BDEs en suero. Los estudios en suero revelan que en las últimas décadas han decrecido los niveles de dioxinas, furanos y PCBs mientras que los niveles de BDEs han aumentado considerablemente.

Tabla 2.3. Niveles de BDEs en polvo de hogares de diferentes localizaciones

Localización	Σ BDEs, ng g ⁻¹	Congéneres, BDE-	Ref.
Suecia	53-4000	28, 47, 99, 153, 183, 197, 206, 207, 208, 209	[102]
Bélgica	4-1214	47, 99, 100, 153, 154, 183, 197, 196, 203	[103]
	<5-5295	209	
Portugal	34-1938	28, 49, 47, 66, 100, 99, 85, 154, 153, 183, 197, 203, 196, 207, 206, 209	[64]
Canadá	160-3600	28, 47, 49, 66, 99, 100, 153, 154	[104]
	290-1100	209	
Nueva Zelanda	13-680	28, 47, 49, 66, 99, 100, 153, 154	[104]
Australia	500-13000	47, 99, 100, 153, 154, 183, 209	[99]
Reino Unido	5.7-610	28, 47, 49, 66, 99, 100, 153, 154	[104]
	120-520000	209	
	950-54000	47, 99, 100, 153, 154, 183, 209	[99]
Estados Unidos	310-14000	28, 47, 49, 66, 99, 100, 153, 154	[104]
	530-3300	209	
	520-29000	47, 99, 100, 153, 154, 183, 209	[99]
Alemania	17-550	47, 99, 100, 153, 154, 183, 209	[99]
Singapur	11-12000	28, 47, 100, 99, 154, 153, 183	[105]
	68-13000	209	
España	14-1739	1, 2, 3, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 15, 17, 25, 28, 30, 32, 33, 35, 37, 47, 49, 66, 71, 75, 77, 85, 99, 100, 116, 118, 119, 126, 138, 153, 154, 155, 166	[106]

2.4. Determinación de BDEs en diferentes tipos de muestras

En los últimos años se han desarrollado métodos analíticos para determinar BDEs en diferentes muestras medioambientales como polvo, sedimentos, lodo, agua, comida, pescado, leche materna, equipamiento eléctrico, etc. En la tabla 2.4. se muestran las técnicas de extracción y limpieza del extracto de algunos de éstos métodos. Las técnicas más comunes para la extracción de BDEs de muestras sólidas son la extracción asistida por microondas (MAE) y la extracción con líquidos presurizados (PLE). A estas etapas de extracción generalmente le sigue una etapa de limpieza del extracto mediante extracción en fase sólida (SPE) con sílice, alúmina o Florisil.

También se han empleado, aunque con menor frecuencia, técnicas como Soxhlet, microextracción en fase sólida (SPME), dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) y extracción con fluidos supercríticos (SFE). En el caso de muestras líquidas como agua se encuentran métodos basados en SPE o microextracción con emulsificación asistida por ultrasonidos (USAEME). Debido a que los BDEs suelen encontrarse en bajas concentraciones, al realizar el análisis mediante cromatografía de gases es frecuente emplear la inyección de grandes volúmenes (LVI) para aumentar la sensibilidad del método. La respuesta se ve incrementada al inyectar volúmenes mayores que los empleados normalmente en cromatografía de gases (1-2 μL). Para la inyección mediante grandes volúmenes se precisa un inyector de temperatura programable (PTV), donde se realiza la inyección en el inserto frío y se incrementa progresivamente su temperatura para producir la evaporación progresiva de los compuestos de mayor a menor volatilidad [107-110].

Aunque hay varias referencias de métodos en los que se usa el detector de captura electrónica (ECD), en la mayoría de los casos la determinación se realiza mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

Para la separación mediante cromatografía de gases, es muy frecuente que se utilice la ionización química negativa (NCI), formándose los iones de cuantificación m/z 79 y 81. En el caso de análisis mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas se suele emplear la fotoionización a presión atmosférica (APPI), formándose los iones m/z 78.8, 80.0, correspondientes al ion bromo.

Tabla 2.4. Métodos para la determinación de BDEs en diferentes muestras.

Muestra	Extracción-Limpieza	Determinación	LOD	Ref.
Polvo doméstico	SFE	LC-NI-APPI-MS/MS	n.d.	[111]
	SPLE	LC-NI-APPI-MS/MS	n.d.	[112]
	MAE-GPC (sílice)	GC-NCI-MS	0.02-40 ng g ⁻¹	[105]
	MAE-SPE (Florisil)	GC-ECD	0.07-1.44 ng g ⁻¹	[113]
	PLE-SPE	GC-NCI-MS	n.d.	[114]
	MAE-SPE (Florisil)	GC-MS/MS	0.29-0.55 ng g ⁻¹	[115]
	PLE-SPE (sílice)	GC-NCI-MS	n.d.	[116]
	USLE-GPC (sílice y alúmina)	GC/ECD-ITMS	0.05-40 pg g ⁻¹	[117]
	SPLE	GC-MS/MS	0.06-0.24 ng g ⁻¹	[110]
	USLE-SPE (sílice acidificada)	GC-ECNI-MS	0.04-17 ng g ⁻¹	[118]
FUSLE	GC-ITMS/MS	0.05-0.8 ng g ⁻¹	[42]	
Agua	SPME	GC-NCI-MS	0.2-3.6 ng L ⁻¹	[119]
	SPE-DLLME	GC-ECD	0.03-0.15 ng L ⁻¹	[120]
	USAEME	GC-ITMS	1-2 ng L ⁻¹	[121]
	SPME	GC-MS/MS	7.5-190 pg L ⁻¹	[76]
	SBSE-LD	LVI-GC-MS	0.3-203.4 ng L ⁻¹	[109]
	HF-LPME	GC-ICP-MS	15.2-40.5 ng L ⁻¹	[82]

Tabla 2.4. cont.

Muestra	Extracción-Limpieza	Determinación	LOD	Ref.
Sedimentos	PLE-GPC-SPE (Florisil)	GC-HRMS	n.d.	[122]
	SPME	GC-MS/MS	3-45 $\mu\text{g g}^{-1}$	[123]
	HSSPME	GC-MS/MS	5-214 $\mu\text{g g}^{-1}$	[124]
	SPLE	GC-NCI-MS	1-46 $\mu\text{g g}^{-1}$	[125]
	Soxhlet-GPC (alúmina-sílice)+SAT	GC-NCI-MS	n.d.	[126]
	USL-DLLME-SFOME	GC-EI-ITMS/MS	0.5-1.8 $\mu\text{g g}^{-1}$	[127]
	SPLE	GC-NCI-MS	n.d.	[128]
Pescado	PLE-GPC-SPE (Florisil)	GC-HRMS	n.d.	[122]
	PLE-SPE (sílice)	LC-APPI-MS/MS	0.0027-3.2 ng g^{-1}	[129]
	(Soxhlet-PLE-MAE)-SPE (sílice)	HRGC-HRMS	n.d.	[130]
	SPLE	GC-MS/MS	10-34 $\mu\text{g g}^{-1}$	[131]
	PLE-GPC (sílice acidificada)	GC-ECD/ITMS	0.13-60 $\mu\text{g g}^{-1}$	[132]
	MSPD	GC-MS	0.05-1.6 ng g^{-1}	[133]
Lodo	MAE-SAT-SPE (sílice)	GC-NCI-MS	1.4-7.7 ng g^{-1}	[134]
	USL-SBSE	GC-MS	0.29-24.5 ng g^{-1}	[88]
	PLE-LLE-SPE-SPE	GC-NCI-MS	0.19-0.67 ng g^{-1}	[89]
	SPLE (alúmina)	UPLC-APCI-MS/MS	0.01-0.14 ng g^{-1}	[135]
	MAE-SPE	GC-EI-MS	0.17-68.2 ng g^{-1}	[119]
	SPLE-MEPS	GC-ITMS/MS	0.02-0.04 ng g^{-1}	[92]

Tabla 2.4. cont.

Muestra	Extracción-Limpieza	Determinación	LOD	Ref.
Materiales electrónicos	PLE-GPC-SPE (Florisil)	GC-HRMS	n.d.	[122]
Leche materna	PLE-SPE (alúmina)	GC-NCI-MS	0.01-0.05 $\mu\text{g Kg}^{-1}$	[84]
	MSPD-SPE (sílice)	HPLC-GC-MS/MS	n.d.	[136]
Comida	MAE-GPC (sílice)	GC-EI-IT-MS	0.04-0.7 pg m^{-3}	[137]
Atmósfera	SFOME	HPLC	0.01-0.04 $\mu\text{g L}^{-1}$	[83]
Orina	SPE (C18)-SPE (sílice acidificada)	GC-NCI-MS	0.2-25 pg mL^{-1}	[81]
Suero	Soxhlet-SPE-SPE (sílice)	GC/MS	0.05-0.3 ng g^{-1}	[107]
Tejido graso	Digestión-LLE-GPC (Florisil)	GC-EI-MS	0.08-0.9 ng g^{-1}	[86]

n.d. No descrito

APPI: Atmospheric Pressure Photo-Ionisation

DLLME: Dispersive Liquid Liquid MicroExtraction

ECD: Electron Capture Detection

EI: Electronic Ionisation

GC: Gas chromatography

GPC: Gel Permeation Chromatography

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

HR: High Resolution

HSSPME: Head Space Solid Phase MicroExtraction

IT: Ion Trap

LC: Liquid Chromatography

LVI: Large Volume Injection

MAE: Microwave Assisted Extraction

MS: Mass Spectroscopy

MSPD: Matrix Solid Phase Dispersion

NCI: Negative Chemical Ionisation

NI: Negative Ionisation

SAT: Sulfuric acid treatment

SBSE: Stir Bar Sorptive Extraction

SFE: Supercritical Fluid Extraction

SFOME: Solidification of Floating Organic Drop Microextraction

SPE: Solid Phase Extraction

SPME: Solid Phase Micro-Extraction

USAEME: Ultrasound Assisted Emulsification MicroExtraction

USL: UltraSound Leaching

Sin embargo, la técnica de ionización más frecuente en cromatógrafos de gases acoplados a espectrometría de masas con trampa de iones es la ionización electrónica (EI). Los iones generados usando EI presentan masas desde m/z 250 para mono-BDEs hasta m/z 800 y 960 para deca-BDE [138]. Por esta razón, en los análisis con detectores de trampa de iones (IT) se suelen determinar los congéneres desde mono-BDEs hasta hexa-BDEs, ya que los iones generados en la ionización de los hepta-BDEs y superiores están en el límite, o lo sobrepasan, del rango de masas (m/z) que pueden ser almacenados en la trampa de iones.

Una solución propuesta por algunos autores consiste en dividir el flujo al final de la separación para determinar los congéneres de octa- a deca-BDE en un detector ECD y el resto de analitos en el detector ITMS [117].

En el caso del deca-BDE, su determinación se dificulta debido a su inestabilidad a altas temperaturas en el inyector y durante su separación cromatográfica, generando congéneres de menor grado de bromación. Por esta razón para la determinación de BDE-209 se hace necesaria una columna corta (15m) que disminuya el tiempo de permanencia en la columna a altas temperaturas y que no se degrade antes de llegar al detector [63, 86, 133, 139].

En esta tesis se desarrollan, optimizan y validan dos métodos para determinación de BDEs de mono-a hexa-bromados en polvo doméstico y un tercer método para su determinación en lodos de depuradora.

Los BDEs se han extraído de diferentes muestras como sedimentos [125], pescado [131] y polvo [112] mediante SPLE incorporando un material sorbente en la celda de extracción pero en ninguno de estos casos se han optimizado las variables de extracción. La extracción de BDEs de polvo doméstico se realiza en la mayoría de los casos mediante MAE selectiva, añadiendo Florisil al realizar la extracción o mediante PLE seguida de una etapa de limpieza usando SPE con columnas de Florisil o sílice. Esta etapa de limpieza incrementa el tiempo de análisis y el consumo de disolventes.

El primer método presentado en esta tesis para determinar BDEs en polvo doméstico se basa en la extracción mediante PLE selectiva, integrando las etapas de extracción y limpieza del extracto en una, obteniendo extractos listos para el análisis mediante GC-MS/MS. El segundo método desarrollado se basa en el empleo de extracción sólido-líquido asistida por ultrasonidos focalizados (FUSLE), que reduce el tiempo de análisis y el empleo de disolvente respecto a los métodos

previamente publicados para el análisis de BDEs en polvo doméstico. En último lugar, se ha desarrollado un método basado en microextracción con sorbentes empaquetados (MEPS) que proporciona una amplificación de la señal analítica que posibilita mejorar los límites de detección.

2.5. Nuevos métodos para la determinación de BDEs en polvo doméstico y lodo de depuradora

A continuación se presentan las publicaciones sobre la determinación de BDEs en polvo doméstico mediante SPLE y FUSLE y la determinación de BDEs en lodo mediante MEPS.

2.5.1.

Desarrollo y validación de un método basado en PLE selectiva para la determinación de BDEs en polvo doméstico

Determination of brominated diphenyl ethers (from mono- to hexa - congeners) in indoor dust by pressurized liquid extraction with in cell clean-up and gas chromatography-mass spectrometry

María Pilar Martínez-Moral, Jose David Carrillo and María Teresa Tena

Analytical and Bioanalytical Chemistry 397 (2010) 257-267

2.5.1. Desarrollo y validación de un método basado en PLE selectiva para la determinación de BDEs en polvo doméstico

En este trabajo se presenta un método basado en extracción selectiva con líquidos presurizados (SPLE) seguida de cromatografía de gases-espectrometría de masas en tándem (GC-MS/MS) para la determinación de BDEs en polvo doméstico. Como se ha descrito en la sección 1.2.1. de la introducción, la extracción selectiva con líquidos presurizados consiste en la adición de un sorbente junto con la muestra en la celda de extracción para realizar simultáneamente las etapas de extracción y limpieza.

Objetivos

1. Desarrollar un método para la determinación en BDEs en polvo doméstico que conste de sólo una etapa en la que se realicen simultáneamente la extracción y la limpieza mediante SPLE.
2. Evaluar la conveniencia de usar espectrometría de masas en tándem frente a espectrometría de masas.
3. Optimizar las variables que afectan a la extracción SPLE para conseguir una extracción exhaustiva.
4. Comprobar la eficacia de la SPLE.
5. Evaluar el empleo de estándar interno para mejorar la precisión del método.
6. Validar el método SPLE-GC-MS/MS y estudiar su linealidad, precisión y exactitud.

Metodología y resultados obtenidos

En primer lugar, se desarrolló el método GC y se evaluó el empleo de MS/MS para la detección de BDEs. La comparación de la relación señal-ruido obtenida mediante MS y MS/MS para cada compuesto demostró que la sensibilidad aumenta empleando la espectrometría de masas en tándem.

Las variables que afectan a la SPLE fueron optimizadas mediante diseños de experimentos. En primer lugar se estudiaron cuatro tipos de sorbentes: arena, Florisil, alúmina y sílice; y tres disolventes de extracción: n-hexano, diclorometano y la mezcla 1:1 n-hexano:diclorometano a dos valores de temperaturas: 40 y 140 °C usando un diseño multivariable 4×3×2.

Los extractos presentaron un aspecto diferente dependiendo del sorbente empleado. Los obtenidos con Florisil o sílice a baja temperatura fueron los aparentemente más limpios, mientras que los obtenidos a altas temperaturas presentaban un color muy intenso y en muchos casos turbidez.

Del estudio de las gráficas de interacción disolvente-temperatura y sorbente-temperatura, se concluyó que las mejores recuperaciones fueron obtenidas usando Florisil como sorbente y la mezcla 1:1 n-hexano:diclorometano a baja temperatura.

A continuación se optimizaron la distribución del sorbente, la temperatura y el tiempo de extracción, usando un diseño central compuesto. El rango de temperaturas estudiado fue de 40 °C a 140 °C y el tiempo de 2 a 12 minutos. La cantidad total de Florisil se mantuvo constante (4 g) y se estudió su distribución en la celda, mezclando una parte con la muestra (de 4 a 2.5 g) y poniendo el resto como una capa adicional (de 0 a 1.5 g).

Para construir las gráficas de respuesta solamente se tuvieron en cuenta los efectos estadísticamente significativos, concluyendo que las condiciones óptimas eran la extracción de la muestra mezclada con 4 g de Florisil, sin capa adicional, con 1:1 n-hexano:diclorometano a 40 °C durante 2 minutos.

Una vez optimizadas las variables SPLE se estudió la influencia del número de ciclos de extracción. No se observaron diferencias entre las recuperaciones obtenidas realizando 1, 2 ó 3 ciclos, por lo que sólo un ciclo de 2 minutos es suficiente para la extracción completa de los BDEs del polvo doméstico.

Se obtuvieron extractos más limpios y cromatogramas con menos ruido usando Florisil como sorbente en la celda en lugar de arena, por lo que la eficacia de la SPLE quedó demostrada.

El método SPLE-GC-MS/MS fue caracterizado en términos de linealidad, sensibilidad, precisión y exactitud. Los límites de detección del método se encuentran entre 0.06 y 0.24 ng g⁻¹ para el BDE-47 y el BDE-154, respectivamente. Con el empleo de un estándar interno (¹³C-BDE-77) se consiguió mejorar la precisión del método, obteniendo valores de repetibilidad menores de 4.5 % y de precisión intermedia menores de 10 %. Se obtuvieron valores de recuperación entre el 82 % para el BDE-3 y el 101 % para el BDE-100. La exactitud del método se evaluó mediante el análisis de un material de referencia, no encontrando

diferencias entre los valores obtenidos experimentalmente y los valores de referencia del material.

Conclusiones

1. Se ha optimizado y validado un método basado en SPLE seguida de GC-MS/MS para la determinación de BDEs en polvo doméstico.
2. Se ha corroborado que con el empleo de espectrometría de masas en tándem mejora la sensibilidad.
3. Las condiciones óptimas de la etapa SPLE son 4 g de Florisil mezclados con la muestra y 1:1 n-hexano:diclorometano como disolvente de extracción a 40 °C durante 2 minutos. Un ciclo de extracción es suficiente para la extracción completa de los BDEs del polvo.
4. Usando SPLE se consigue un extracto más limpio que puede ser directamente analizado mediante GC-MS/MS.
5. Con el empleo de ^{13}C -BDE-77 como estándar interno se consigue mejorar la precisión del método, hasta valores de repetibilidad menores de 4.5 % (DER) y de precisión intermedia por debajo del 10 % (DER).
6. La exactitud del método se comprobó mediante el análisis de un material de referencia, no se encontraron diferencias entre el valor certificado y el obtenido mediante el método SPLE-GC-MS/MS.
7. El método propuesto integra en una sola etapa la extracción y la limpieza, por lo que es un método más simple, que precisa menos volumen de disolvente y un menor tiempo de análisis que los precedentes para la determinación de BDEs en polvo doméstico.

2.5.2.

Desarrollo y validación de un método basado en FUSLE para la determinación de BDEs en polvo doméstico

Focused ultrasound solid-liquid extraction and gas chromatography tandem mass spectrometry determination of brominated flame retardants in indoor dust

María Pilar Martínez-Moral and María Teresa Tena

Analytical and Bioanalytical Chemistry 404 (2012) 289-295

2.5.2. Desarrollo y validación de un método basado en FUSLE para la determinación de BDEs en polvo doméstico

En esta sección se describe el desarrollo y validación de un método basado en extracción FUSLE seguida de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en tándem para la determinación de BDEs en polvo doméstico. La extracción FUSLE ha sido descrita en la sección 1.2.2., y se propone como una alternativa para reducir el tiempo y el coste del análisis.

Objetivos

1. Desarrollar un método para la determinación de BDEs en polvo doméstico basado en extracción sólido-líquido con ultrasonidos focalizados.
2. Optimizar las variables que afectan a la extracción FUSLE.
3. Validar y caracterizar el método FUSLE-GC-MS/MS, en términos de linealidad, límites de detección, precisión y exactitud.
4. Realizar el análisis de muestras de polvo doméstico.

Metodología y resultados obtenidos

En primer lugar, se estudió el disolvente de extracción más adecuado. Se compararon las recuperaciones usando diclorometano, *n*-hexano y las mezclas 1:1 *n*-hexano:diclorometano, 1:1 *n*-hexano:acetona y 3:1 *n*-hexano:acetona. El empleo de una mezcla de disolventes favorece la extracción, siendo la mezcla 3:1 *n*-hexano:acetona la que proporciona una mejor extracción para BDE-99 y BDE-154. Por lo tanto, el disolvente de extracción seleccionado fue la mezcla 3:1 *n*-hexano:acetona.

Las variables que pueden afectar a la extracción FUSLE (volumen de disolvente, potencia de irradiación y tiempo de extracción) fueron estudiadas mediante un diseño central compuesto 2^3 . El volumen de extracción se estudió desde 8 mL hasta 16 mL, la potencia desde el 30% hasta el 100% y el tiempo desde 20 hasta 120 segundos. Los resultados ANOVA del CCD mostraron que el efecto cuadrático de la potencia era significativo para el BDE-47, y se encontró óptima una potencia de 65 %. Para minimizar el tiempo de análisis y el consumo de disolventes, se

decidió usar 8 mL de disolvente de extracción y 20 segundos como tiempo de extracción.

Una vez optimizada la etapa de extracción, se estudiaron el número de ciclos necesarios para conseguir una extracción exhaustiva. Se estudiaron 1, 2 y 3 ciclos, y no se observaron diferencias significativas entre las recuperaciones obtenidas, por lo que se concluyó que 1 ciclo era suficiente para la extracción completa de los BDEs del polvo doméstico.

Se comprobó la ausencia de efecto matriz mediante la comparación de la pendiente de la regresión lineal de las rectas de calibrado obtenidas en matriz y en disolución estándar. A continuación se procedió a la caracterización del método FUSLE-GC-MS/MS, obteniendo límites de detección entre 0.05 y 0.8 ng g⁻¹, valores de repetibilidad por debajo del 10% y valores de recuperación entre el 93 % y el 111 %.

La exactitud del método se determinó mediante el análisis de un material de referencia; no encontrándose diferencias entre los valores de concentración certificados y los obtenidos con el método FUSLE-GC-MS/MS.

El método desarrollado se aplicó al análisis de cinco muestras reales de polvo doméstico. Se encontraron altas concentraciones de BDE-47, BDE-99, BDE-100, BDE-153 y BDE-154 en algunas de las muestras y el BDE-47 y el BDE-99 fueron detectados en todas las muestras analizadas. La concentración total de BDEs fue muy variable, desde 13.5 hasta 1738.8 ng g⁻¹.

Conclusiones

1. Se ha desarrollado un método FUSLE-GC-MS/MS para la determinación de BDEs en polvo doméstico.
2. Se han optimizado las variables que afectan a la extracción, resultando óptimo el empleo de 8 mL de 3:1 n-hexano:acetona durante 20 segundos al 65 % de potencia.
3. Un ciclo de extracción es suficiente para la extracción completa de los BDEs.
4. El método propuesto no está afectado por errores causados por efecto matriz.

5. Se obtuvieron excelentes valores de recuperación y valores de repetibilidad y límites de detección similares a los métodos descritos previamente. La exactitud del método fue demostrada mediante el análisis de un material de referencia.
6. Se obtuvieron valores muy variables de concentración de BDEs en las muestras reales analizadas, detectándose los BDEs 47 y 99 en todas las muestras.
7. El método FUSLE-GC-MS/MS es una alternativa rápida y económica para la determinación de BDEs en polvo doméstico.

2.5.3.

Desarrollo y validación de un método basado en MEPS para la determinación de BDEs en lodo de depuradora

Use of microextraction by packed sorbents following selective pressurized liquid extraction for the determination of brominated diphenyl ethers in sewage sludge by gas chromatography-mass spectrometry

María Pilar Martínez-Moral and María Teresa Tena

Journal of Chromatography A 1364 (2014) 28-35

2.5.3. Desarrollo y validación de un método basado en MEPS para la determinación de BDEs en lodo de depuradora

A continuación se describe el desarrollo de un método para la determinación de BDEs en lodo de depuradora que consta de una extracción SPLE seguida de una etapa de limpieza mediante extracción con sorbentes empaquetados (MEPS) y el análisis GC-MS/MS. La técnica MEPS, que se basa en la miniaturización de la extracción en fase sólida (SPE), ha sido detallada en la sección 1.2.3. de la Introducción.

En este trabajo, se propone una etapa de limpieza y preconcentración de extractos SPLE usando MEPS, ya que la limpieza que se lleva a cabo en la celda al realizar la extracción selectiva con líquidos presurizados no es suficiente para obtener extractos listos para el análisis GC-MS/MS. En ensayos preliminares se observó que la inyección directa de estos extractos produce supresión de las señales, sobre todo en los penta- y hexa-BDEs, y ensucia el sistema de modo que no se pueden realizar varios análisis consecutivos. Por estos motivos se propone una etapa MEPS automatizada y en línea con la cromatografía de gases, que se realiza en el automuestreador con inyección directa del eluato en el GC-MS/MS.

Objetivos

1. Desarrollar un método para la determinación de BDEs en lodo de depuradora empleando MEPS para la limpieza del extracto SPLE y seguido de GC-MS/MS.
2. Optimizar las variables que afectan a la etapa MEPS.
3. Validar y caracterizar el método SPLE-MEPS-GC-MS/MS, en términos de linealidad, límites de detección, precisión y exactitud.
4. Comprobar la ausencia de efecto memoria al reutilizar los cartuchos MEPS.
5. Evaluar el empleo de MEPS para la limpieza del extracto y el aumento de sensibilidad del método.
6. Realizar el análisis de BDEs en muestras de lodo de depuradora.

Metodología y resultados obtenidos

En primer lugar, se estudió el sorbente MEPS más adecuado para la retención de BDEs, seleccionándose el cartucho de C18. Se estudió también el disolvente más adecuado para la redisolución de los extractos SPLE con objeto de favorecer la posterior etapa MEPS. Para ello, se realizó el estudio simultáneo de cuatro disolventes (acetona, acetonitrilo, isopropanol y tetrahidrofurano) y tres porcentajes de agua en el extracto (90, 75 y 50%) mediante un diseño multivariable 4×3 . Los resultados fueron que el mejor disolvente para los extractos es acetona:agua 25:75.

En segundo lugar, se estudió el volumen de hexano necesario para la completa elución de los BDEs del cartucho. Se probaron 50 y 100 μL de hexano, y se calculó la recuperación eluyendo de una a cuatro veces con el mismo volumen. Se escogió la elución una sola vez con 100 μL de hexano, que recupera más del 90 % de los compuestos. Para completar el estudio de la etapa de elución se realizó un diseño central compuesto 2^2 para optimizar la velocidad de elución y la velocidad de inyección en el inyector de grandes volúmenes. El rango estudiado fue de 1 a 25 $\mu\text{L s}^{-1}$; seleccionándose 25 y 13 $\mu\text{L s}^{-1}$ para la velocidad de elución e inyección, respectivamente.

A continuación se estudiaron las variables de la aplicación de la muestra que afectan a la eficacia de retención de los BDEs en el cartucho de C18. Las condiciones seleccionadas fueron 10 etapas de carga-descarga de 250 μL de muestra a 5 $\mu\text{L s}^{-1}$ y una etapa de secado pasando aire 5 veces a través del cartucho.

Tras la elución, se realiza una etapa de lavado del cartucho con 3 porciones de 250 μL de hexano. Esta limpieza es suficiente para evitar el efecto memoria y poder de este modo reutilizar los cartuchos.

Una vez optimizadas las variables que afectan a la etapa MEPS, se procedió a la caracterización del método. Se obtuvieron valores de desviación estándar relativa menores del 7 % y recuperaciones del 92 al 102 %. Los límites de detección instrumentales oscilaron entre 0.4 y 2 pg mL^{-1} para BDE-28 y BDE-100, respectivamente; y los límites de detección del método están por debajo de los 0.4 ng g^{-1} . El método propuesto se aplicó al análisis de un material de referencia,

obteniéndose valores de concentración estadísticamente iguales a los valores de referencia certificados.

Sin embargo, pese a la etapa de limpieza incorporada, el método SPLE-MEPS-GC-MS/MS presenta efecto matriz, por lo que se propone la calibración mediante adición estándar para evitar errores en el análisis de muestras reales. En los lodos de las EDARs de La Rioja se encontraron niveles de BDEs comprendidos entre 16.2 y 45.6 ng g⁻¹.

Conclusiones

1. Se ha desarrollado y validado un método SPLE-MEPS-GC-MS/MS para la determinación de BDEs en lodo de depuradora.
2. El medio más adecuado para la retención de BDEs en el cartucho C18 es acetona:agua 25:75.
3. Se han optimizado las variables que afectan a la etapa de retención de los analitos y a la etapa de elución.
4. La limpieza mediante MEPS se realiza de forma automática y en línea con la determinación GC-MS/MS, lo que simplifica el proceso analítico y acorta el tiempo de análisis.
5. Tras el lavado del cartucho tras su uso, no hay efecto memoria por lo que el cartucho MEPS puede ser reutilizado.
6. El uso de MEPS mejora los límites de detección instrumentales y metodológicos publicados anteriormente para BDEs en lodo de depuradora.
7. El método presenta excelentes valores de recuperación (superiores al 92 %) y de repetibilidad (con valores de desviación estándar relativa menores del 7 %).
8. Se propone la cuantificación mediante adición estándar porque la sensibilidad se ve afectada por efecto matriz.
9. Los lodos de depuradoras de La Rioja analizados presentan niveles de BDEs comprendidos entre 16.2 y 45.6 ng g⁻¹, mucho menores que los encontrados en otras localizaciones.

10. El empleo de MEPS en línea con la cromatografía de gases aumenta la sensibilidad del método y disminuye el tiempo de análisis, el volumen de disolvente empleado y el coste del análisis.

3

Alquilfenoles y Bisfenol A

3.1. Alquilfenoles

- 3.1.1 Estructura, propiedades y fuentes de emisión de los APs
- 3.1.2. Efectos en el medio ambiente y en la salud humana
- 3.1.3. Determinación de APs en diferentes tipos de muestras

3.2. Bisfenol A

- 3.2.1. Estructura y usos del BPA
- 3.2.2. Efectos en el medio ambiente y en la salud humana
- 3.2.3. Determinación de BPA en diferentes tipos de muestras

3.3. Nuevos métodos para la determinación de alquilfenoles y bisfenol A en lodo de depuradora



3. ALQUILFENOLES Y BISFENOL A

3.1. ALQUILFENOLES

Los xenoestrógenos son un tipo de disruptores endocrinos con la capacidad de actuar de la misma manera que los estrógenos naturales (WHO/IPCS,2002). Entre los xenoestrógenos, se sitúan los 4-alkilfenoles (APs) y entre ellos son de especial importancia el octilfenol (OP) y nonilfenol (NP). En esta tesis se han desarrollado métodos de análisis para la determinación de OP y NP además de otros alquilfenoles como son tert-butilfenol (t-BP), butilfenol (BP), pentilfenol (PP), hexilfenol (HxP), heptilfenol (HpP) y tert-octilfenol (t-OP).

3.1.1 Estructura, propiedades y fuentes de emisión de APs

Una de las fuentes de emisión de alquilfenoles es la industria energética, que produce APs como subproductos en la fabricación y uso de productos petroquímicos [140]. Los APs también son usados como estabilizantes de resinas y ésteres, en la fabricación de plásticos para artículos de uso doméstico y comercial, textiles, papel, detergentes y polímeros [141-143]. En la figura 1.3.1 se muestran las estructuras de los 4-alkilfenoles estudiados en esta tesis.

Los alquilfenolpolietoxilatos (APEOs) son surfactantes no iónicos que han sido muy usados desde los años 40 en la producción de petróleo, textiles y papel, y en la formulación de pesticidas y productos de limpieza y de cuidado personal debido a sus propiedades como desemulsificantes, antiespumantes, dispersantes y solubilizantes. En la actualidad, la producción anual de APEOs alcanza las 500000 toneladas, el 55% de las cuales se usan en producción industrial, el 30% en productos para la salud y el 15% para productos de limpieza y de cuidado personal [144]. La degradación de APEOs durante el tratamiento aeróbico o anaeróbico de lodos de depuradora o por acción de microorganismos o fotólisis en la naturaleza deriva en la formación de alquilfenoles [107, 112, 143, 145].

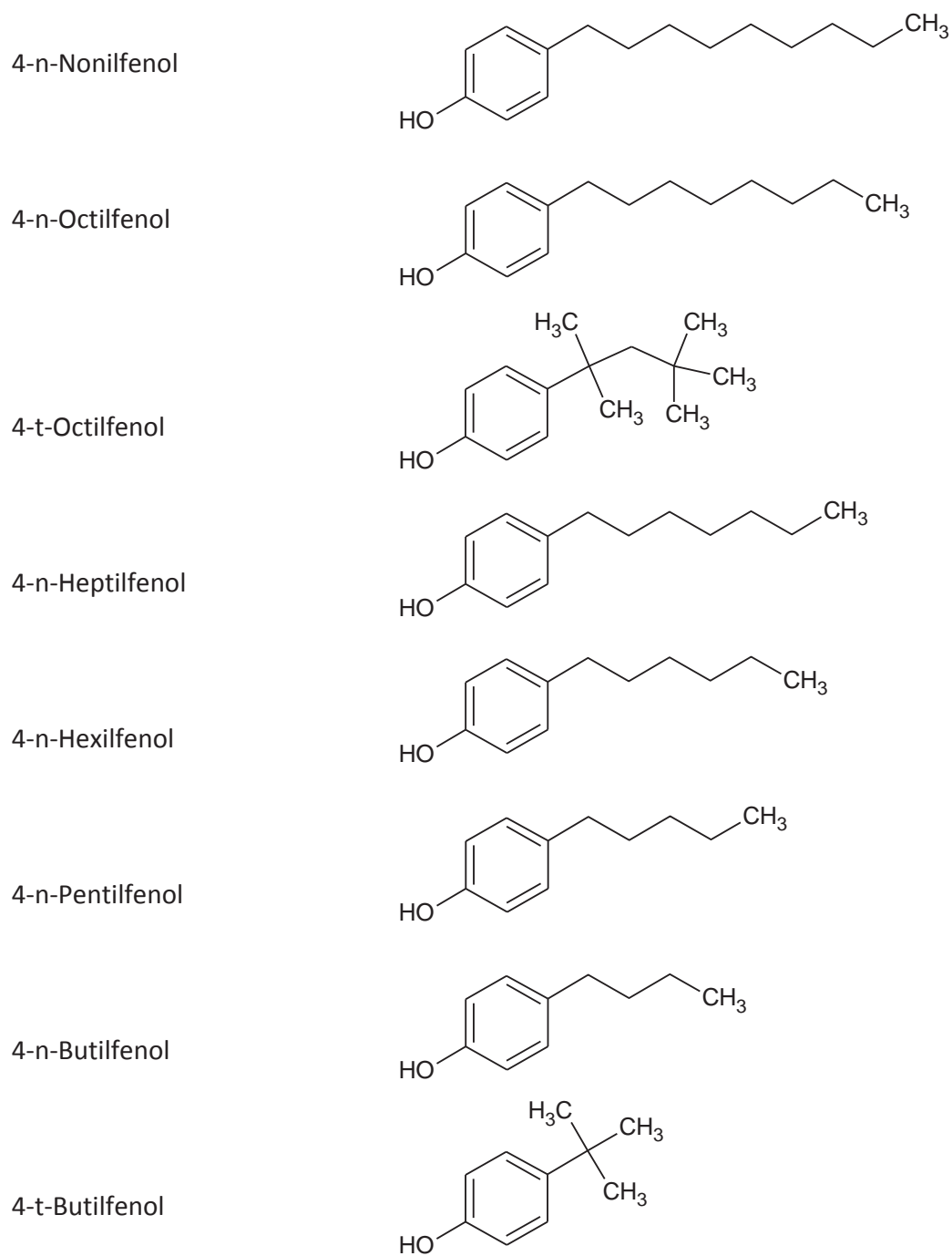


Fig. 3.1. Estructura de los alquilfenoles estudiados en esta tesis.

3.1.2. Efectos en el medio ambiente y en la salud humana

Para combatir la contaminación del medio acuático, el Parlamento Europeo elaboró un listado de contaminantes, entre los que se encuentran los APs, cuyas emisiones al medio ambiente deben ser restringidas o prohibidas (European Water Framework Directive 2000/60/EC. Decision no. 2455/2001/EC adopted by the European Parliament and the Council on November 20, 2001). Después, en 2006, la Comisión adoptó una directiva con el propósito de establecer los niveles permitidos de estos contaminantes en la liberación de desechos y aguas residuales, para asegurar un estado químico satisfactorio del agua [146]. En la norma 2008/105/EC se indican los contaminantes que deben ser monitorizados en aguas superficiales. En esta norma, se legislan los niveles máximos de octilfenol y nonilfenol en agua en 0.1 y 2 ng mL⁻¹, respectivamente. Desde entonces, se ha trabajado en la determinación de estos compuestos en matrices como agua, agua residual [146, 147] y lodo de depuradora. De los estudios in-vitro e in-vivo se concluye que los APs presentan diferente toxicidad según la longitud de la cadena alquil- y la ramificación de la misma, siendo los más tóxicos el nonilfenol (NP) y el octilfenol [148, 149]. Los APs liberados al medio ambiente se bioacumulan y son persistentes. Se incorporan a la cadena alimentaria acumulándose especialmente en las especies acuáticas. En agua, el octilfenol y el nonilfenol son tóxicos en concentraciones de 90-140 y 93-470 ng mL⁻¹, respectivamente (EC50-48h, *Daphnia magna*). Estos contaminantes actúan como la hormona femenina estrógeno, y pueden causar el cambio de sexo de peces, de macho a hembra, y provocar una disminución de la capacidad reproductiva.

Se han detectado concentraciones de alquilfenoles en diferentes muestras medioambientales; Ko et al. encontraron altas concentraciones de heptilfenol, nonilfenol, t-butilfenol y t-octilfenol en aguas de Corea [150] y son los disruptores endocrinos que presentan una mayor concentración en aguas de España [151]. La determinación de APs en lodos de depuradora es un indicador de los niveles de contaminación del medio acuático. Estos niveles varían enormemente según la localización (tabla 3.1); los compuestos analizados más frecuentemente son nonilfenol y octilfenol. En esta tesis, se determinan también otros alquilfenoles en lodos de La Rioja.

Tabla 3.1. Niveles encontrados en lodos de diferentes localizaciones

Localización	Compuesto	Concentración, ng g ⁻¹	Ref.
China	NP	243.9 ± 2.1	[152]
	NP	22800	[153]
	OP	n.d.	[153]
	t-OP	100	[153]
	NP	2309 ± 28	[154]
España	NP	150-172	[155]
	NP	23500-300	[156]
	OP	7.5	[157]
	OP	199000-4800	[156]

Estamos expuestos a APs principalmente a través del consumo de comida y de agua contaminada. En diferentes estudios se han detectado concentraciones de APs en muestras de agua embotellada, huevos y leche [143, 158, 159]. La exposición a APs se ha relacionado con problemas de fertilidad en hombres [114, 119, 150, 152] y se les atribuye actividad cancerígena [88].

3.1.3. Determinación de APs en diferentes tipos de muestras

La determinación de APs en muestras líquidas (agua, agua residual, bebidas, plasma, orina) se ha realizado principalmente mediante extracción en fase sólida seguida de cromatografía y espectrometría de masas (tabla 3.2).

La determinación de estos compuestos en lodo es muy importante, ya que es un indicador del nivel de contaminación del medio acuático. El análisis de APs en lodos se ha llevado a cabo, al igual que otras muestras sólidas como sedimentos, suelo, cereales, etc., generalmente mediante extracción con líquidos presurizados o por extracción sólido líquido asistida por ultrasonidos. Estas extracciones son normalmente seguidas de una limpieza mediante SPE o GPC antes del análisis cromatográfico [154-156].

Tabla 3.2. Determinación de APs en diferentes tipos de muestras

Muestra	Extracción-limpieza	Determinación	LOD	Ref.
Lodo	SFE	GC-MS	-	[152]
	USLE-SPE	LC-MS	5 ng g ⁻¹	[155]
	PLE-SPE	LC-MS/MS	0.5 ng g ⁻¹	[157]
	PLE-SPE	GC-MS	0.3-0.7 ng g ⁻¹	[153]
	USLE-SPE-GPC	GC-MS	63 ng g ⁻¹	[154]
	USLE-SPE	GC-MS	300 ng g ⁻¹	[156]
	PLE-SPE	LC-MS/MS	6-10 ng g ⁻¹	[172]
	SPLE	GC-MS	1.2 - 41.6 ng g ⁻¹	[34]
Agua	LLE	GC-MS	0.1-0.01 ng mL ⁻¹	[173]
	LLE	GC-MS	1 ng mL ⁻¹	[160]
	SPME	GC-MS	0.1-0.01 ng mL ⁻¹	[140]
	SPE	GC-MS	0.8-2.6 ng mL ⁻¹	[141]
	LPME	GC-MS	0.005-0.011 ng mL ⁻¹	[164]
	SPE	GC-MS	1.5-3.3 ng L ⁻¹	[168]
	SPE	GC-MS	2 ng L ⁻¹	[159]
Agua residual	SPE	GC-MS	7-10 ng L ⁻¹	[166]
	SPE	GC-MS	18-166 ng L ⁻¹	[147]
Sedimentos	PLE-SPE	LC-MS	1 ng g ⁻¹	[174]
	MAE-GPC	GC-MS	0.5 ng g ⁻¹	[175]
	USLE-GPC	GC-MS	0.2 ng g ⁻¹	[176, 177]
Suelo	PLE-SPE	LC-APCI-MS	30 ng g ⁻¹	[178]
Aire	Soxhlet-GPC	GC-MS	0.002-0.008 ng m ³	[165]
Pescado	SLE-GPC	GC-MS	1-10 ng g ⁻¹	[173]
Moluscos	SPLE	LC-MS/MS	0.5-1.4 ng g ⁻¹	[25]
Bebidas	SPE	LC-MS/MS	0.01-0.05 ng L ⁻¹	[142]
Cereales	PLE-SPE	LC-MS	3-12 ng g ⁻¹	[179]
Huevos	MSPD-SPE	LC-MS/MS	0.05-0.10 ng g ⁻¹	[143]
Leche	MSPD-SPE	LC-MS/MS	0.1-0.25 ng g ⁻¹	[143]
Plasma	SPE	GC-MS	0.05 ng mL ⁻¹	[163]
Orina	SPE	HPLC-MS/MS	0.15-0.18 ng mL ⁻¹	[180]

La técnica de separación y detección más común para estos compuestos es la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Debido a la polaridad de los APs, para el análisis mediante GC es necesaria una etapa previa de derivatización que transforme los fenoles en derivados menos polares y más volátiles. La reacción más común es la sililación, utilizando como derivatizante N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) [140, 153, 160-166] para obtener el derivado trimetilsililfenol (fenol-TMS). Otros autores han usado otros reactivos derivatizantes como N-Methyl-N-tert-butildimetilsililtrifluoroacetamida (MTBSTFA) para formar el -tert-butildimetilsililfenol (fenol-tBTMS) [167-169], el cloruro de dansilo (cloruro de 1-dimetilaminonaftaleno-5-sulfonilo) que forma el derivado dansilado haciendo posible la detección mediante fluorescencia [170], el trifluoruro de boro en metanol para realizar una metilación [171], etc.

3.2. BISFENOL A

El Bisfenol A (BPA) es el disruptor endocrino al que más estamos expuestos, ya que está presente en todo tipo de productos que utilizamos casi a diario. Entorno a este compuesto se ha generado un debate entre los que aseguran que no genera ningún problema para la salud y los profesionales sanitarios que reúnen datos que documentan su peligrosidad. Por esto, son numerosos los estudios encaminados a establecer su toxicidad y a desarrollar métodos de análisis para establecer los niveles de contaminación en muestras biológicas y medioambientales, así como el mecanismo de migración desde diferentes productos, especialmente los envases destinados a alimentación.

3.2.1. Estructura y usos del BPA

El bisfenol A (4,4'-(propano-2,2-diil)difenol) ha sido muy usado en la fabricación de productos como plásticos, resinas epoxi, PVC, dispensadores de agua, recubrimiento de latas de comida, selladores dentales, etc. por lo que el ser humano está altamente expuesto al BPA. En 2002 se produjeron 2.8 millones de toneladas de BPA, y se estima que en 2011 la producción fue de 5.5 millones de toneladas. En 2011 el uso del BPA en la fabricación de biberones fue prohibido en Europa [7] como medida preventiva ya que los bebés y los niños son más vulnerables a los efectos de los disruptores endocrinos.

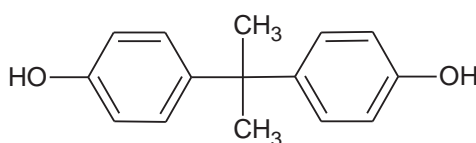


Fig. 1.4.1. Estructura del BPA

3.2.2. Efectos en el medio ambiente y en la salud humana

El bisfenol A es un conocido disruptor endocrino. Se han realizado numerosos estudios (más de 300) que relacionan el BPA con efectos nocivos en la salud de animales. El BPA puede ligarse a los receptores del estrógeno, del andrógeno y de la tiroides. También puede afectar a otros órganos y sistemas fisiológicos, como el sistema nervioso en desarrollo, el páncreas y el sistema inmunológico y tiene efecto sobre el metabolismo de la tiroides y la función cerebral.

La exposición a BPA es preocupante para el ser humano por su acción como disruptor endocrino y porque estamos expuestos diariamente a altas cantidades de este compuesto. Se ha detectado BPA en la mayoría de muestras de orina analizadas de adultos y niños, en la leche materna, en el cordón umbilical y la placenta, etc. Aunque no son demasiados los estudios realizados en humanos, la exposición en adultos se podría asociar con infertilidad, alteración del nivel de hormonas tiroideas y sexuales, diabetes tipo 2, problemas cardiovasculares, alteración de la función hepática, obesidad, etc. La exposición en fetos y niños afecta a su desarrollo, tiempo de gestación, obesidad, asma, etc. [181].

Debido a la alta dispersión de este contaminante, es encontrado frecuentemente en aguas residuales municipales o de industrias en las que se producen compuestos químicos, papel, plásticos, etc. El BPA no es completamente degradado durante el tratamiento del agua en las plantas depuradoras de aguas residuales y está por lo tanto presente en el efluente y el lodo generado, que a su vez puede ser reutilizado en actividades agrícolas [182, 183]. Se han encontrado 620 ng g⁻¹ de bisfenol A en lodos de Grecia [184], concentraciones entre 101 y 127 ng g⁻¹ en China [154] y hasta 945 ng g⁻¹ en lodos españoles [185].

3.2.3. Determinación de BPA en diferentes tipos de muestras

Se ha descrito la determinación de BPA en una gran variedad de matrices biológicas, medioambientales, etc. También se ha estudiado la migración desde biberones [159] y desde el material de recubrimiento de latas al contenido de las mismas [186, 187].

En cuanto a la derivatización para su análisis por cromatografía de gases, se realiza de igual forma que para alquifenoles. La reacción más usada es la formación del derivado sililado, normalmente usando BSTFA como reactivo derivatizante [141,

154, 164, 166, 169, 184, 188, 189]. Aunque se han estudiado otros tipos de derivatización, como la acetilación con anhídrido acético, se ha demostrado que el empleo de BSTFA proporciona una mejora en la sensibilidad del método [187].

Se han desarrollado métodos para la detección de BPA en agua y aguas residuales, generalmente basados en extracción líquido-líquido o extracción en fase sólida. En cuanto a su determinación en lodo, se ha empleado generalmente la extracción sólido-líquido asistida por ultrasonidos. El análisis de los extractos se ha realizado en la mayoría de los casos mediante cromatografía de gases tras una etapa de derivatización. Los métodos para el análisis de orina y alimentos se han basado, sin embargo, en cromatografía líquida (tabla 3.3).

En esta tesis, se desarrollan dos métodos para el análisis de BPA en lodo basados en la extracción selectiva con disolventes presurizados (SPLE) y en la extracción sólido-líquido con ultrasonidos focalizados (FUSLE). Tras la etapa de extracción, el análisis se realiza mediante cromatografía de gases que, aunque hace necesaria una etapa adicional de derivatización, proporciona mayor sensibilidad al método.

3.3. Nuevos métodos para la determinación de alquilfenoles y bisfenol A en lodo de depuradora

A continuación se encuentra la publicación que ha resultado del estudio de la aplicación de la SPLE y la FUSLE en la determinación de APs y BPA en lodo de depuradora. Los métodos descritos con anterioridad para la determinación de bisfenol A y alquilfenoles se basan en la extracción sólido-líquido asistida por ultrasonidos y en la extracción con líquidos presurizados, respectivamente, seguidas de una etapa SPE de limpieza del extracto.

Con este trabajo se pretende simplificar el método de análisis para la determinación simultánea de BPA y APs.

Tabla 3.3. Determinación de BPA en diferentes tipos de muestras

Muestra	Extracción-limpieza	Determinación	LOD	Ref.
Bebidas	SPE	LC-MS/MS	15-25 ng L ⁻¹	[190]
Huevos y leche	MSPD-SPE	LC-MS/MS	0.10 ng g ⁻¹	[143]
Cereales	PLE	LC-MS	43 ng g ⁻¹	[191]
Conservas	SPME	HPLC-FD	1.1 µg L ⁻¹	[186]
	SPME	GC-MS	0.016 µg L ⁻¹	[187]
Moluscos	SPLE	LC-MS/MS	0.9 ng g ⁻¹	[25]
Agua	SPME	GC-MS	0.01 µg L ⁻¹	[140]
	SPE	GC-MS	5.3 µg L ⁻¹	[141]
	LPME	GC-MS	0.014 µg L ⁻¹	[164]
	SPE	GC-MS	0.14 µg L ⁻¹	[184]
	SPE	NCI-GC-MS	0.7 ng L ⁻¹	[159]
Agua residual	LLE	GC-MS	0.006 µg L ⁻¹	[192]
	LLE	GC-MS	0.3	[188]
	SPE	GC-MS	26.5 ng L ⁻¹	[189]
	SPE	GC-MS/MS	2.5 ng L ⁻¹	[189]
	SPE	GC-MS	50 ng L ⁻¹	[166]
	VCE	LC-FD	9 ng L ⁻¹	[193]
Lodo	Soxhlet	HPLC-FD	-	[170]
	USLE-SPE	GC-MS	0.56 µg g ⁻¹	[184]
	USLE-SPE-GPC	GC-MS	1.3 ng g ⁻¹	[154]
	USLE-SPE	LC-MS/MS	34 ng g ⁻¹	[185]
	SPLE	GC-MS	10.7 ng g ⁻¹	[34]
Sedimentos	MAE-GPC	GC-MS	1 ng g ⁻¹	[175]
Tierra	USLE	GC-MS	0.03 ng g ⁻¹	[169]
Plasma	SPE	GC-MS	0.05 µg L ⁻¹	[163]
Saliva	LLE	GC-MS	3 µg L ⁻¹	[194]
Orina	LLE	LC-APCI-MS/MS	0.3 µg L ⁻¹	[195]
	FC	UPLC-MS	10 µg L ⁻¹	[196]
	SPE	HPLC-MS	0.32 µg L ⁻¹	[180]

3.3.1.

Desarrollo, validación y comparación de dos métodos, basados en PLE selectiva y en FUSLE, para la determinación de APs y BPA en lodo de depuradora

Focused ultrasound solid-liquid extraction and selective pressurized liquid extraction to determine bisphenol A and alkylphenols in sewage sludge by gas chromatography-mass spectrometry

María Pilar Martínez-Moral and María Teresa Tena

Journal of Separation Science 34 (2011) 2513-2522

3.3.1. Desarrollo, validación y comparación de dos métodos, basados en PLE selectiva y en FUSLE, para la determinación de APs y BPA en lodo de depuradora.

Este trabajo comienza con la optimización de la derivatización de alquilfenoles y bisfenol A para transformarlos en sus derivados volátiles y hacer posible su determinación mediante GC-MS. A continuación se encuentra descrito el desarrollo de dos métodos analíticos par determinar alquilfenoles y bisfenol A en lodo de depuradora. El primer método, se basa en la extracción SPLE y el segundo método en la extracción FUSLE.

Objetivos

1. Poner a punto un método GC-MS para la separación y detección de alquilfenoles y bisfenol A.
2. Optimizar la etapa de derivatización.
3. Estudiar la estrategia de secado del lodo más adecuada para evitar la pérdida de analitos.
4. Desarrollar un método para la determinación de alquilfenoles y bisfenol A en lodo de depuradora basado en extracción SPLE.
5. Desarrollar un método para la determinación de alquilfenoles y bisfenol A en lodo de depuradora basado en extracción sólido-líquido con ultrasonidos focalizados.
6. Comparar ambos métodos en términos de recuperación, repetibilidad y sensibilidad para seleccionar el método de extracción más adecuado.
7. Validar y caracterizar el método en términos de linealidad, límites de detección, precisión y exactitud.
8. Conseguir un método simple, que evite la etapa SPE de limpieza del extracto.

Metodología y resultados obtenidos

En primer lugar se realizó la optimización de las variables que afectan a la derivatización de los alquilfenoles y bisfenol A en matriz de lodo. Se probaron dos derivatizantes: MTBSTFA y BSTFA, de los cuales se seleccionó el segundo porque proporcionó mejores resultados. Para la optimización del resto de variables, se

realizó un diseño central compuesto 2^3 , que permitió estudiar la influencia del tiempo de derivatización (15 o 30 minutos), el volumen de derivatizante (50 o 200 μL) y la temperatura de derivatización (50 o 150 $^{\circ}\text{C}$). Ninguna de estas variables tuvo un efecto significativo en la respuesta, por lo que se seleccionaron las siguientes condiciones: 50 μL de BSTFA a 50 $^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos para acortar el tiempo de análisis y el consumo de derivatizante.

A continuación se estudiaron tres formas de secado de la muestra: liofilización, secado en estufa a 40 $^{\circ}\text{C}$ y adición de un desecante (sulfato de sodio anhidro). Se demostró que la liofilización es la técnica más adecuada, al obtenerse las mejores recuperaciones.

Una vez establecidas las condiciones de secado y derivatización, se estudió el proceso de extracción de APs y BPA en lodo mediante SPLE. En primer lugar, se estudió la posibilidad de limpieza en la misma celda, mediante fraccionamiento con otro disolvente antes de la extracción de los analitos con acetato de etilo. Se probaron hexano y diclorometano seleccionando condiciones suaves de temperatura (40 $^{\circ}\text{C}$), pero con n-hexano no se consiguió limpieza alguna, y con diclorometano se producían pérdidas de recuperación. El hexano a una temperatura superior (100 $^{\circ}\text{C}$) tampoco consigue un extracto final más limpio, por lo que se descarta realizar una limpieza previa. El estudio de las variables que afectan a la SPLE continuó con un diseño multivariante $5 \times 2 \times 2$, en el que se estudiaron 5 sorbentes (arena, Florisil, alúmina, sílice y C18), a dos temperaturas (50 y 100 $^{\circ}\text{C}$) y dos disolventes de extracción (diclorometano y acetato de etilo). La arena se incluyó en el estudio como referencia. Tras el análisis de los datos se seleccionaron Florisil como sorbente y diclorometano como disolvente de extracción. La optimización de la temperatura, el tiempo de extracción y la proporción de masa de sorbente-masa de muestra en la celda se llevó a cabo mediante un diseño central compuesto 2^3 . Los valores seleccionados fueron 1 minuto a 130 $^{\circ}\text{C}$. La relación masa de sorbente-masa de muestra no es un efecto significativo en la recuperación, por lo que se llegó a un compromiso entre la limpieza del extracto y la sensibilidad del método (estudiando la relación señal-ruido). Finalmente se seleccionaron 4 g de Florisil mezclados con 0.5 g de lodo. Se probaron 1, 2 y 3 ciclos de extracción, siendo suficiente uno para la extracción completa de los APs y el BPA del lodo.

Para el desarrollo del método basado en FUSLE, se probaron en primer lugar el efecto de cuatro disolventes de extracción (acetona, acetato de etilo, diclorometano y metanol) en la recuperación. Se seleccionó acetato de etilo, y se estudiaron la potencia, el periodo de irradiación y tiempo de extracción mediante un diseño central compuesto 2^3 . Los valores óptimos fueron un 75 % de potencia, un periodo de irradiación de 0.5 y un tiempo de extracción de 20 segundos. El volumen de extractante, el número de etapas de extracción y su posible correlación se estudiaron mediante un diseño multivariable del que se concluyó que 8 mL de disolvente y una etapa de extracción son suficientes para la extracción completa FUSLE.

Una vez optimizados ambos métodos, se compararon calculando las recuperaciones obtenidas con ambos. Las recuperaciones FUSLE fueron mucho menores, llegando al 35 % para bisfenol A, mientras que con el método SPLE se consiguen recuperaciones del 81 al 105 % para todos los analitos.

Para finalizar, se establecieron la repetibilidad, la precisión y la linealidad del método SPLE-GC-MS. Se obtuvieron límites de detección entre 1.2 y 41.6 ng g⁻¹. La repetibilidad expresada como desviación estándar relativa fue menor del 6 %, y la recuperación superior al 81 %.

Conclusiones

1. Se ha estudiado la derivatización de los APs y el BPA para su determinación mediante GC-MS, y se han seleccionado 50 μ L de BSTFA a 50 °C durante 15 minutos.
2. La liofilización del lodo de depuradora es la estrategia de secado más adecuada.
3. Las condiciones óptimas para la extracción SPLE fueron 4 g de Florisil mezclados con 0.5 g de muestra que se extrae a 130 °C durante 1 minuto. Una sola etapa de extracción fue suficiente para conseguir una extracción exhaustiva.
4. La extracción FUSLE se produce en condiciones óptimas con 8 mL de acetato de etilo, al 75 % de potencia, 0.5 ciclos y una sola etapa de 20 segundos.
5. La comparación de las recuperaciones obtenidas con ambos métodos, permite concluir que el método SPLE es mejor que el FUSLE.

6. Se obtienen límites de detección menores de 42 ng g^{-1} , recuperaciones por encima del 81 % y valores de desviación estándar relativa menores del 6 % con el método SPLE-GC-MS.

7. Se ha propuesto un método rápido, económico y simple para la determinación de APs y BPA en lodo de depuradora.

4

Compuestos Perfluorados (PFCs)

- 4.1. Estructuras y usos de los PFCs
- 4.2. Fuentes y efectos de la emisión de PFCs
- 4.3. Determinación de PFCs en diferentes tipos de muestras
- 4.4. Nuevos métodos para la determinación de PFCs en embalajes de comida y lodo de depuradora



4. COMPUESTOS PERFLUORADOS (PFCs)

Los compuestos perfluorados (PFCs) se usan como protectores de superficies en la fabricación de numerosos productos, algunos de ellos muy populares como el Teflón y el Goretex.

4.1. Estructuras y usos de los PFCs

Los compuestos perfluorados (PFCs) tienen una estructura en la que los átomos de hidrógeno de la cadena hidrofóbica son sustituidos por átomos de flúor. El enlace flúor-carbono es más fuerte que el carbono-hidrógeno, lo que aumenta la estabilidad química y térmica de estos compuestos y los hace hidrofóbicos, oleofóbicos y tensoactivos. Por estas propiedades se han empleado en la fabricación de materiales resistentes al agua y los aceites, como por ejemplo en la fabricación de embalaje de cartón para comida rápida, papel de horno, insecticidas, productos antiadherentes presentes en algunos utensilios de cocina o tejidos aislantes. También se usan en espumas ignífugas y como tratamiento anti-manchas de superficies en alfombras y tejidos, en la síntesis de PTFE, en lubricantes y en pinturas, etc. [7].

Además, otros compuestos como los polifluoroalquil fosfatos PAPs o los fluorotelómeros FTOHs, que se emplean como tensoactivos en productos de limpieza y en embalaje de comida, se pueden degradar metabólicamente o atmosféricamente dando como resultado ácidos carboxílicos perfluorados (PFCAs), con lo que se incrementan los niveles de concentración de éstos últimos en el medio ambiente [197-199].

En la figura 4.1 se muestran las estructuras de los compuestos perfluorados estudiados en esta tesis: el ácido perfluoroheptanoico (PFHpA), el ácido perfluorooctanoico (PFOA), el ácido perfluorononanoico (PFNA), el ácido perfluorodecanoico (PFDA), ácido perfluoroundecanoico (PFUnA), el ácido perfluorododecanoico (PFDoA) y perfluorooctanosulfonato (PFOS).

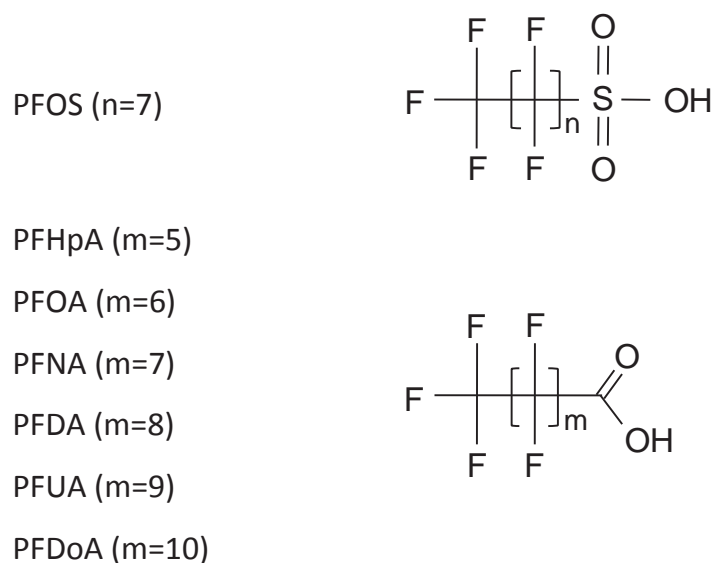


Figura 4.1. Estructuras de los PFCAs estudiados en esta tesis.

4.2. Fuentes y efectos de la emisión de PFCs

Una vez liberados al medio ambiente, los PFCs son resistentes a hidrólisis, fotólisis y procesos metabólicos, lo que les hace extremadamente persistentes.

Algunos estudios encaminados a estudiar la acumulación y los efectos sobre la salud de animales han demostrado que los PFCAs y el PFOS afectan al metabolismo de lípidos, dañan el sistema inmunológico, causan problemas de desarrollo y son cancerígenos, pudiendo causar cáncer de hígado [200, 201]. Con estos precedentes en animales, la dispersión de PFCs en el medio ambiente y su exposición es preocupante para la población. Las principales rutas de exposición son la dieta [202-204], los embalajes de comida de los que pueden migrar al contenido [197, 205-209], los productos de limpieza y de cuidado personal o el polvo doméstico [210]. La acumulación en personas se ha estudiado mediante el análisis de sangre [211, 212] y tejidos [213]. Se han detectado PFCs en muestras de sangre de personas en todo el mundo, siendo el PFOS el compuesto mayoritario seguido del PFOA. Aunque los estudios en personas son limitados, se ha demostrado que los PFCs actúan como disruptores endocrinos, interfiriendo en el metabolismo de la hormona tiroidea [7, 214].

4.3. Determinación de PFCs en diferentes tipos de muestras

La determinación de PFCs puede realizarse mediante cromatografía de gases realizando una etapa previa de derivatización que transforme los ácidos perfluorados en derivados más volátiles; formando metil ésteres, isobutil ó butil ésteres [216-218]. Sin embargo, este método no es válido para PFOS ya que sus ésteres son muy inestables [219]. Por esto aunque algunos PFCs neutros y volátiles como los fluorotelómeros y las sulfonamidas sí se pueden analizar directamente mediante GC [220, 221], y algunos otros tras su derivatización, la cromatografía de gases no es la técnica elegida por la mayoría de los investigadores (Tabla 4.1).

La mayoría de los métodos publicados para la determinación de PFCs, emplean cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas. En muchos de estos trabajos se usan disoluciones de acetato de amonio (2-20 mM) como fase móvil para incrementar la señal y la sensibilidad del método. El modo de ionización más frecuente es ESI negativa, aunque en el análisis de muestras medioambientales frecuentemente se produce efecto matriz. Para evitar este problema, Takino et al. [222] desarrollaron un método usando APPI pero, aunque evita el efecto matriz, no permite detectar PFOS y presenta límites de detección mayores que los correspondientes usando ESI.

A la hora de desarrollar métodos de análisis para la determinación de PFCs, es conveniente evitar el uso de materiales fabricados a partir de fluorotelómeros, como el el PTFE ó teflón, para evitar interferencias en los blancos. Otras fuentes de contaminación en el laboratorio pueden ser los cartuchos SPE de C18, los recipientes de polipropileno o el agua destilada [215].

El análisis de muestras líquidas, como agua o agua residual, se realiza normalmente mediante extracción en fase sólida (SPE). En cuanto a la determinación de PFCs en muestras sólidas, en los trabajos más antiguos se realizaba extracción sólido-líquido (SLE) con tert-metilbutil éter; por ejemplo, para la extracción de hígado, ostras, etc. Esta técnica se ha sustituido en los últimos años por métodos basados en PLE y en extracción sólido-líquido asistida por ultrasonidos para el análisis de embalajes de comida, lodo y sedimentos. La extracción asistida por ultrasonidos es simple y económica, pero puede llegar a tardar horas, lo que alarga considerablemente el tiempo de análisis [205], y tanto

USLE como PLE necesitan una etapa posterior de limpieza, generalmente mediante SPE.

Tabla 4.1. Determinación de PFCs en diferentes tipos de muestras

Muestra	Extracción-limpieza	Determinación	LOD	Ref.
Agua	SPE	LC-ESI-MS/MS	0.005-0.02 ng L ^{-1*}	[223]
	SPE	LC-ESI-MS/MS	0.4-5.2 pg L ^{-1*}	[224]
	SPE	LC-ESI-MS/MS	0.01-1 ng L ⁻¹	[225]
	SPE	LC-ESI-MS/MS	5-25 ng L ⁻¹	[226]
	SPE	LC-ESI-MS	2-8 ng L ⁻¹	[227]
	Evaporación-derivatización	GC-EI-MS	0.03-0.31 µg mL ⁻¹	[218]
	SPE	LC-APCI-MS/MS	0.05 ng L ⁻¹	[228]
Agua residual	LLE-SPE	GC-NCI-MS	20 ng L ⁻¹	[216]
	SPE	LC-ESI-MS/MS	2-8 ng L ^{-1*}	[227]
	Centrifugación	LC-ESI-MS/MS	n.d.	[229]
Sedimentos	PLE-HS-SPME	GC-NCI-MS	0.5-0.8 ng g ⁻¹	[217]
	USLE-SPE	LC-ESI-MS/MS	0.011-0.122 ng g ⁻¹	[230]
	SLE-SPE	LC-APCI-MS/MS	0.01 ng g ⁻¹	[228]
Lodo	USLE-SPE	LC-ESI-MS/MS	0.7-2.2 ng g ⁻¹	[230]
	PLE-SPE	LC-ESI-MS/MS	6-10 mg kg ⁻¹	[231]
	PLE-SPE	LC-ESI-MS/MS	15-79 ng kg	[232]
	IPM-SPE	LC-ESI-MS/MS	0.6-5 ng g ⁻¹	[233]
	FUSLE	UPLC-MS/MS	0.06-0.2 ng g ⁻¹	[43]
	USLE-SPE	UPLC-MS/MS	0.14-0.71 ng g ⁻¹	[234]
Aire	SLE-GPC	LC-ESI-MS	n.d.	[235]

* LOQ (LOD no descritos)

n.d.: no descritos

Tabla 4.1. cont. Determinación de PFCs en diferentes tipos de muestras

Muestra	Extracción-limpieza	Determinación	LOD	Ref.
Alimentos	SLE-SPE	LC-ESI-MS/MS	1-30 pg g ⁻¹	[204]
Embalaje para alimentos	USLE-SPE	LC-ITMS	25 pg mL ⁻¹	[205]
	USLE	LC-MS/MS	n.d.	[237]
	PLE-SPE	LC-ESI-MS/MS	0.20-0.94 ng g ⁻¹	[238]
	PLE	UHPLC-qToF-MSMS	0.6 - 16 ng g ⁻¹	[239]
	FUSLE	UHPLC-qToF-MSMS	0.2-0.7 ng g ⁻¹	[240]
	PLE	GC-MS	n.d.	[206]
Pescado	SLE-SPE	LC-ESI-MS/MS	0.52-1.89 ng g ^{-1*}	[241]
	PLE-SPE	LC-ITMS	0.01-0.05 ng g ^{-1*}	[242]
Biota	Digestión-GPC	LC-ESI-MS/MS	0.03-3 ng g ⁻¹	[225]
	LLE	LC-ESI-MS/MS	n.d.	[236]
Ostras	SLE	LC-ESI-MS/MS	10 ng g ^{-1*}	[243]
Plasma	SPE	LC-ESI-MS/MS	0.1-0.4 ng mL ⁻¹	[244]
	SPE	LC-ESI-MS	0.05-0.25 ng mL ⁻¹	[245]
Sangre	SPE	LC-ESI-MS	0.1-2 ng mL ⁻¹	[246]
Hígado	SLE	LC-ESI-MS/MS	2-8.5 ng g ⁻¹	[247]

* LOQ (LOD no descritos)

n.d.: no descritos

El análisis de lodos se ha realizado principalmente mediante PLE [232]. Schroder et al. compararon en 2003 el empleo de PLE y otras técnicas clásicas para la extracción de PFCs de lodo, resultando ser la PLE la técnica más eficaz. En esta tesis, se recoge un trabajo en el que se aúnan la etapa de extracción y limpieza mediante SPLE, evitando de esta manera la etapa SPE posterior a la extracción.

En la tabla 4.2 se recogen datos de los niveles de PFCs encontrados en lodos en diferentes localizaciones. Los compuestos que se encuentran más frecuentemente son el PFOA, el PFNA, el PFDA y el PFDoA, siendo muy variables los valores de concentración encontrados en diferentes países. El PFOS es el compuesto del que se encuentran concentraciones mayores, llegando a 670 ng g^{-1} en algunos lodos de Suiza en 2010.

Tabla 4.2. Niveles de PFCAs y PFOS (ng g^{-1}) encontrados en lodo de distintas localizaciones

Localización	PFHpA	PFOA	PFNA	PFOS	PFDA	PFUnA	PFDoA	Ref.
España	<0.01-2	<0.03-8	<0.01-10	<0.01-286.8	<0.04-24	n.a.	n.a.	[248]
	<LOQ-4.5	9.5-30.3	1.1-2.4	53.0-121.1	6.1-23.5	<LOQ-12.2	2.7-11.3	[232]
	n.d.-1.84	n.d.-2.82	n.d-<LOQ	<LOQ-3.03	n.d.-1.02	n.d.-0.44	n.d.-0.48	[43]
Estados Unidos	5.4-9.7	8.4-128	4.7-15.2	32.2-346.3	3.4-43.9	4.2-22.8	2.5-19.7	[249]
	n.a.	n.d.-29.4	n.d.-10.3	14.4-2610	<3-72.5	n.d.-8.58	n.d.-32.7	[230]
Corea	n.d.	n.d.-5.3	n.d-<LOQ	3.3-54.1	n.d.-11.8	n.d.-10.8	n.d.-8.7	[250]
Holanda	n.a.	n.a.	n.a.	35-48	n.a.	n.a.	n.a	[228]
China	0.5-137	9.2-75.5	<LOQ-4.6	1-135	0.3-6.2	2.6-23.4	<LOQ-4.5	[251]

n.a. no analizado

n.d. no detectado

Se han desarrollado métodos para el análisis de embalajes de comida debido al extenso uso de PFCs como aditivos en su fabricación. Por sus características, las bolsas para palomitas para microondas son una de las muestras más representativas, debido a su recubrimiento interior y porque se puede suponer que durante su uso en el microondas podrían migrar compuestos desde dicho recubrimiento al maíz. Varios investigadores han analizado PFCs en bolsas de palomitas para microondas, así en 2005 Begley et al. encontraron niveles de hasta 290 ng g^{-1} de PFOA en bolsas de palomitas de USA [237]. En China, en 2009, Lv et

al. encontraban niveles de 17.5-45.9 ng g⁻¹ de PFOA y 33.7-81.3 ng g⁻¹ de PFOS [206]. En el trabajo que aquí se recoge, se amplió la lista de compuestos analizados, y se encontraron concentraciones variables de seis PFCAs y PFOS en embalajes de tres marcas de palomitas para microondas. Recientemente, en 2014, C. Moreta y M.T. Tena encontraron niveles de 3.50 a 750 ng g⁻¹ de PFCs, siendo PFHxA el compuesto predominante. En dicho trabajo se analizó el maíz antes y después del cocinado, y no se encontraron evidencias de la migración de los PFCs presentes en el embalaje a las palomitas [240].

4.4. Nuevos métodos para la determinación de PFCs en embalajes de comida y lodo de depuradora

A continuación se encuentran las publicaciones que han resultado del estudio de la determinación de PFCs en bolsas de palomitas para microondas mediante PLE y la determinación de PFCs en lodo mediante FUSLE.

4.4.1.

Desarrollo y validación de un método PLE-UPLC-MS/MS para la determinación de PFCs en embalaje de palomitas de maíz para microondas

**Determination of perfluorocompounds in popcorn packaging by
pressurized liquid extraction and ultra performance liquid
chromatography-tandem mass spectrometry**

María Pilar Martínez-Moral and María Teresa Tena

Talanta 101 (2012) 104-109

4.4.1. Desarrollo y validación de un método PLE-UPLC-MS/MS para la determinación de PFCs en embalaje de palomitas de maíz para microondas

En este trabajo se desarrolla un método PLE para extraer seis ácidos alquilcarboxílicos perfluorados y perfluorooctanosulfonato. Se propone por primera vez el uso de UPLC y (QToF)MS/MS para determinar estos compuestos en los extractos de embalaje de palomitas de maíz para microondas.

Objetivos

1. Poner a punto un método UPLC para la separación de PFCAs y PFOS.
2. Seleccionar el mejor método de detección, MS o MS/MS, y optimizar los parámetros del detector para aumentar la sensibilidad de la señal.
3. Optimizar la etapa de extracción PLE.
4. Comprobar si las señales se ven afectadas por efecto matriz.
5. Caracterizar el método PLE-UPLC-MS/MS.
6. Analizar muestras reales.

Metodología y resultados obtenidos

El estudio comenzó con la puesta a punto de un método UPLC-QToF-MS para la determinación cuantitativa de PFCs. Se probaron diferentes gradientes de disolventes para la separación cromatográfica y se estudió el modo de detección y la relación de suma para la cuantificación. Se consiguió separar los siete compuestos estudiados en menos de 4 minutos. La relación de suma fue optimizada para cada compuesto, y la sensibilidad aumentó usando MS/MS en lugar de MS.

Para optimizar la etapa de extracción PLE con metanol, primero se estudiaron la temperatura (desde 50 hasta 150 °C) y el tiempo (desde 1 a 11 minutos) usando un diseño central compuesto 2^2 . Del estudio de la función de optimización multivariable se concluyó que los valores óptimos son 100 °C y 6 minutos. Después se estudió el efecto de realizar 1, 2 o 3 ciclos de extracción, y se observó que un solo ciclo es suficiente para la extracción cuantitativa de los PFCs.

Para estudiar la existencia o no de efecto matriz, se compararon las pendientes de los ajustes lineales de calibración en disolvente y en presencia de matriz de muestra. Las pendientes resultaron ser similares, por lo que el método no presentaba efecto matriz y se pudo realizar la cuantificación mediante estándar externo.

Durante la caracterización y validación del método se obtuvieron buenos valores de precisión, con desviación estándar relativa inferior al 8 %, límites de detección entre 0.6 y 16 ng g⁻¹ y excelentes valores de recuperación, en torno al 100%.

El método PLE-UPLC-MS/MS se aplicó al análisis de muestras reales de bolsas de palomitas para microondas. Se encontraron niveles altos de PFOA en todas las muestras analizadas, entre 53 y 198 ng g⁻¹. Se detectaron también concentraciones variables de PFHpA, PFNA, PFDA y PFDoA en algunas de las muestras. La concentración total de PFCs osciló entre 159 y 549 ng g⁻¹.

Conclusiones

1. Se ha desarrollado un método UPLC-QTOF-MS/MS para la determinación cuantitativa de PFCs en bolsas de palomitas para microondas.
2. El empleo de la espectrometría de masas en tándem aumenta la sensibilidad.
3. El método desarrollado presenta límites de detección instrumentales menores que los publicados anteriormente por otros autores.
4. Las variables óptimas para la etapa de extracción PLE fueron un ciclo de extracción de 6 minutos con metanol a 100 °C.
5. El método no presenta efecto matriz y la cuantificación se realiza mediante estándar externo.
6. Al caracterizar el método se obtuvieron valores de recuperación excelentes, en torno al 100 % y valores de desviación estándar relativa inferiores al 8 %.
7. Es la primera vez que se han determinado PFHpA, PFNA, PFDA y PFDoA en embalaje de palomitas para microondas.
8. Se han detectado altas concentraciones de PFOA en las bolsas de palomitas analizadas.

9. Se ha desarrollado un método para determinar PFCs en embalaje que no requiere etapa de limpieza mediante SPE, y por lo tanto es más económico, rápido y simple.

4.4.2.

Desarrollo y validación de un método basado en FUSLE para la determinación de PFCs en lodo de depuradora

Focused ultrasound solid-liquid extraction of perfluorinated compounds from sewage sludge

María Pilar Martínez-Moral and María Teresa Tena

Talanta 109 (2013) 197-202

4.4.2. Desarrollo y validación de un método basado en FUSLE para la determinación de PFCs en lodo de depuradora

En este trabajo se desarrolla un método para determinar PFCs en lodo de depuradora y se propone la extracción FUSLE como alternativa a la extracción PLE. De esta forma se evita la etapa de limpieza del extracto, lo que simplifica el método y se acorta el tiempo de extracción.

Objetivos

1. Desarrollar un método FUSLE-UPLC-MS/MS para el análisis de PFCs en lodos de depuradora.
2. Comprobar la estabilidad de los PFCs sometidos a FUSLE.
3. Optimizar las variables que afectan a la extracción FUSLE.
4. Comprobar si las señales se ven afectadas de efecto matriz.
5. Caracterizar el método FUSLE-UPLC-MS/MS.
6. Comparar el método desarrollado con la extracción PLE.
7. Analizar muestras reales.

Metodología y resultados obtenidos

En primer lugar, se comprobó la estabilidad de los PFCs sometidos a FUSLE. A continuación, se estudiaron las variables que afectan a la etapa de extracción comenzando por el tipo de disolvente. Se probaron metanol, metanol acidificado, metanol:acetonitrilo 1:1, acetona:metanol 1:3 y acetonitrilo. Usando acetonitrilo se obtuvieron los mejores valores de recuperación, y además los extractos parecían más limpios que con el resto de disolventes.

Después se estudió el tiempo (de 20 a 120 segundos), el volumen de acetonitrilo (de 8 a 16 mL) y la potencia (de 30 a 90 %) mediante un diseño central compuesto 2^3 . El único factor que mostró un efecto estadísticamente significativo fue el tiempo de extracción, y sólo para uno de los compuestos (PFDA). Por último se estudió el número de extracciones que se realizan a la muestra (1, 2 ó 3). Se observó que con el segundo ciclo de extracción se incrementaba la recuperación de algunos compuestos hasta un 18 %, sin embargo no había diferencias entre

realizar 2 ó 3 extracciones. Por lo tanto, se seleccionaron 2 ciclos de extracción de 20 segundos a una potencia intermedia de 65 % y con 8 mL de disolvente.

Una vez optimizada la etapa de extracción, se estudió el efecto de la matriz de muestra en la sensibilidad. Se construyeron dos rectas de calibrado, una a partir de disoluciones estándar y otra fortificando el extracto a los mismos niveles de concentración. Se compararon las pendientes resultantes de sendos ajustes por mínimos cuadrados y se observaron diferencias entre las pendientes para todos los analitos. El efecto matriz más importante correspondió al PFDoA. Por esto, se propuso la cuantificación mediante adición estándar.

El método proporciona límites de detección entre 0.06 y 0.2 ng g⁻¹, y valores de repetibilidad por debajo del 8 % (desviación estándar relativa). Las recuperaciones de muestras fortificadas estuvieron por encima del 83 %, excepto para PFHpA (69 %) y PFNA (75 %).

Una vez desarrollado el método, se comparó con la extracción PLE. Se obtuvieron resultados similares para todos los compuestos exceptuando PFHpA y PFNA, como se esperaba ya que presentan las menores recuperaciones FUSLE.

Finalmente se analizaron siete muestras de lodo de depuradora. El PFOA, con concentraciones por debajo de 2.82 ng g⁻¹, y el PFOS con valores menores de 3.03 ng g⁻¹ fueron los compuestos encontrados con mayor frecuencia.

Conclusiones

1. Los PFCs son estables bajo condiciones FUSLE.
2. Las condiciones óptimas para la extracción FUSLE de lodo son 8 mL de acetonitrilo y aplicar ultrasonidos focalizados durante 20 segundos a una potencia del 65 %, realizando el proceso por duplicado con otra alícuota de acetonitrilo para la extracción exhaustiva de los PFCs del lodo.
3. La cuantificación debe realizarse mediante adición estándar debido a la presencia de efecto matriz.
4. Los límites de detección son menores de 0.2 ng g⁻¹, la desviación estándar relativa porcentual en condiciones de repetibilidad es menor del 8 % y las recuperaciones aceptables.

5. Con el método desarrollado se obtienen resultados similares a los obtenidos usando PLE para la mayoría de los PFCs estudiados.
6. Las muestras reales analizadas tienen niveles bajos de PFCs, comparados con los descritos en la bibliografía para muestras de otras localizaciones.

5

Retardantes de llama organofosforados

5.1. Estructuras y usos de los OPFRs

5.2. Toxicidad y efectos de la emisión de OPFRs al medio ambiente

5.3. Determinación de OPFRs en diferentes tipos de muestras

5.4. Desarrollo y validación de un método para la determinación de BPA-BDPP, PBDPP y otros OPFRs en sedimentos y lodos de depuradora



5. RETARDANTES DE LLAMA ORGANOFOSFORADOS

La toxicidad de los compuestos halogenados empleados como retardantes de llama, como son los BDEs, llevó a su prohibición. Como alternativa, se plantea el uso de compuestos organofosforados (OPFRs); sin embargo, su estudio ha desvelado que algunos de estos compuestos pueden tener también efectos nocivos en la salud y sobre el medio ambiente.

5.1. Estructura y usos de los OPFRs

Los retardantes de llama organofosforados han sido usados en los últimos años en la fabricación de numerosos productos. Se estima que los OPFRs representaron el 20 % del total de compuestos retardantes de llama usados en Europa en 2006, que ascendió a 465.000 toneladas.

En esta tesis se han estudiado los siguientes OPFRs: el tris(2-cloroetil)fosfato (TCEP), el tris(1,3-dicloroisopropil)fosfato (TDCIPP), el tris(fenil) fosfato (TPHP o TPP), el tris(metilfenil) fosfato (TMPP o TCP), el tris(butil) fosfato (TNBP), el 2-etilhexildifenilfosfato (EHDPP), el tris(2-etilhexil)fosfato (TEHP), el tris(2-butoxietil)fosfato (TBOEP), el tris(isobutil) fosfato(TIBP), el tris(2-cloroisopropil)fosfato (TCIPP), el resorcinol bis-(difenilfosfato) (PBDPP o RDP) y el bisfenol A bis(difenilfosfato) (BPA-BDPP o BDP). En la tabla 5.1 se muestran la estructuras de estos compuestos.

El uso de los retardantes de llama organofosforados se ha extendido para sustituir el empleo de los retardantes de llama bromados (BFRs). De estos compuestos, el TCEP, el TCIPP y el TDCIPP tienen átomos de cloro, lo que ayuda a disminuir su movilidad en el producto final y aumenta su efectividad como retardante de llama. La tendencia es sustituir los OPFRs halogenados por retardantes de llama no halogenados (HFFRs) como el PBDPP o el BPA-BDPP, que además presentan mayores puntos de ebullición que hacen más difícil su liberación al medio ambiente [252].

En la tabla 5.2 se muestran algunas de las propiedades físico-químicas de los OPFRs estudiados. Sus características varían según su masa molecular y su estructura. Su solubilidad en agua decrece conforme aumenta la masa molecular, lo que hace disminuir su dispersión en el medio acuático.

Tabla 5.1. Estructura de los OPFRs estudiados en este trabajo.

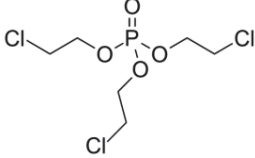
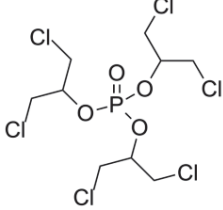
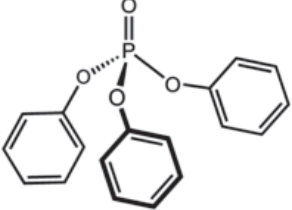
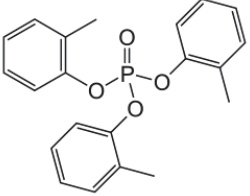
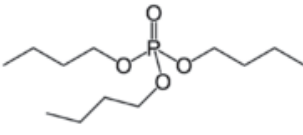
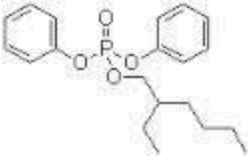
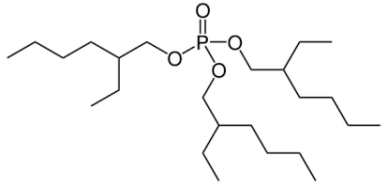
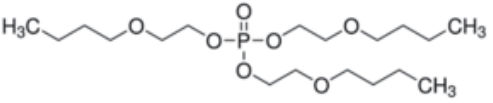
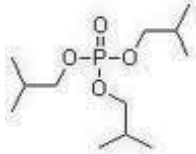
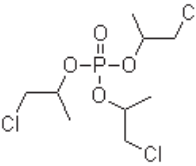
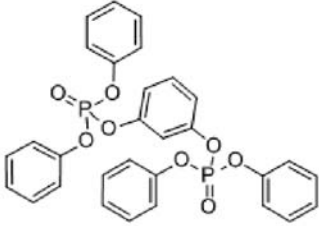
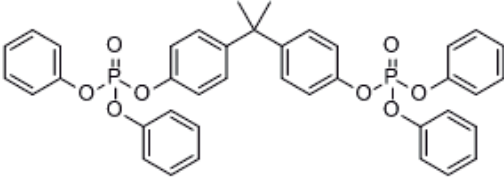
Acrónimo	Compuesto	Estructura
TCEP	tris(2-cloroetil)fosfato	
TDCIPP	tris(1,3-dicloroisopropil)fosfato	
TPHP	tris(fenil) fosfato	
TMPP	tris(metilfenil) fosfato	
TNBP	tris(n-butil) fosfato	
EHDPP	2-etilhexil difenil fosfato	

Figura 5.1. cont. Estructura de los OPFRs estudiados en este trabajo.

Acrónimo	Compuesto	Estructura
TEHP	tris(2-etilhexil)fosfato	
TBOEP	tris(2-butoxyetil)fosfato	
TIBP	tris(isobutil) fosfato	
TCIPP	tris(2-cloroisopropil)fosfato	
PBDPP	resorcinol bis(difenilfosfato)	
BPA-BDPP	bisfenol A bis(difenilfosfato)	

El factor de bioconcentración para HFFRs aumenta para mayores masas moleculares por lo que los retardantes de llama no halogenados de mayor masa molecular se encuentran con mayor frecuencia en el medio ambiente.

Tabla 5.2. Propiedades físico-químicas de los OPFRs estudiados.

Compuesto	Punto de ebullición, °C	Solubilidad en agua a 25 °C, (mg L ⁻¹)	log K _{ow}	log K _{oc}
TCEP	351	7.0 · 10 ³	1.44	2.48
TDCIPP	457	1.50	3.8	2.35
TPHP	370	1.90	4.59	3.72
TMPP	439	0.36	5.11	4.35
TNBP	289	280	4.00	3.28
EHDPP	421	1.90	5.73	4.21
TEHP	220	0.6	4.22	6.87
TBOEP	414	1.20 · 10 ³	3.65	4.38
TIBP	264	3.72	3.6	3.05
TCIPP	359	1.60 · 10 ³	2.59	2.21
PBDPP	587	1.11 · 10 ⁻⁴	7.41	4.63
BPA-BDPP	680	0.415	4.5	4.53

log K_{oc}: Coeficiente de adsorción en suelo

Los compuestos organofosforados se usan como retardantes de llama o como plastificantes. Por una parte, los alquilfosfatos como TNBP, TIBP, TPHP o TBOEP son generalmente usados como plastificantes o lubricantes, y en algunos casos como retardantes de llama. Por otro lado, los compuestos organofosforados halogenados se han usado principalmente como retardantes de llama. El trifenilfosfato se ha empleado junto con otros retardantes de llama halogenados y no halogenados como componentes de mezclas comerciales muy usadas para la síntesis de espumas de poliuretano. Los OPFRs también son usados para la síntesis de PVC, textiles, plásticos, lacas, recubrimientos, flúidos hidráulicos, componentes electrónicos, pegamentos, distintos tipos de resinas, etc.[252].

5.2. Toxicidad y efectos de la emisión de OPFRs al medio ambiente

Los OPFRs, al ser empleados como aditivos que no están químicamente unidos al producto final, pueden ser liberados desde el producto final al medio ambiente. Los compuestos organofosforados halogenados son resistentes a la luz solar, mientras que el TBOEP, el TNBP y el TIBP se degradan al estar expuestos a la luz. Los trifenilfosfatos son liberados al medio acuático debido a fugas de fluidos hidráulicos y migración de plásticos. El TPHP se adsorbe sobre sedimentos, su biodegradación es rápida y no es considerado persistente o bioacumulativo, sin embargo se han detectado niveles de hasta $160 \mu\text{g Kg}^{-1}$ en sedimentos.

Se han detectado OPFRs en aire y polvo doméstico, en agua, sedimentos y biota, con excepción de PBDPP y BPA-BDPP de los que no hay datos de concentración en el medio ambiente. En todos los estudios, TCIPP ha sido el compuesto mayoritario, lo que es lógico al ser el compuesto que se produce una gran cantidad y es relativamente persistente en el medio ambiente. Las concentraciones de diferentes OPFRs encontradas en sedimentos se muestran en la tabla 5.2.

Varios OPFRs han sido clasificados como disruptores endocrinos. El TMPP, el TPHP y el TDCIPP actúan aumentando los niveles de estrógenos mientras que el TCEP y el TEHP los disminuyen o inhiben su efecto [253]. Además, el TMPP y el TCEP pueden actuar como toxinas reproductivas, y el TCIPP, el TDCIPP y TCEP se consideran potencialmente cancerígenos.

5.3. Concentraciones de diferentes OPFRs en sedimentos.

Compuesto	Localización	Rango de concentración	Referencias
TPHP	Noruega-Austria	<0.10 - 160 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[254, 255]
TMPP	Noruega	<0.05 - 288 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[254]
TCP	Noruega	0.15 - 24000 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[254, 256]
TCEP	Austria-Noruega	n.d. - 5500 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[255, 256]
TDCIPP	Noruega	<0.09 - 8800 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[254, 256]

n.d. No detectado

En cuanto a PBDPP y BPA-BDPP, no hay evidencias de efectos nocivos para la salud y al no haber datos de concentración en el medio ambiente es difícil evaluar su impacto [252].

5.3. Determinación de OPFRs en diferentes tipos de muestras

Se han desarrollado métodos para la determinación de OPFRs en aire, agua, biota, polvo doméstico y sedimentos. En la tabla 5.4 se muestran las técnicas de extracción, separación y detección empleadas junto con los límites de detección obtenidos.

Los materiales usados para el muestreo de aire como filtros, cartuchos, espumas o membranas, son extraídos normalmente mediante extracción sólido-líquido asistida por ultrasonidos (USLE). La extracción de agua, se ha realizado en la mayoría de los casos mediante SPE o LLE.

Tabla 5.4. Métodos desarrollados para el análisis de OPFRs en diferentes tipos de muestras.

Muestra	Extracción-limpieza	Determinación	LOD	Ref.
Aire	USLE	GC-MS/MS	0.1-1.4 ng m ⁻³	[257]
	SPE	LC-MS/MS	0.4-19 µg m ⁻³	[258]
	SPE	GC-NPD	0.1-0.3 ng m ⁻³	[259]
	USLE	GC-MS	n.d.	[260]
	Soxhlet	GC-NPD	n.d.	[260]
	SPME	GC-NPD	n.d.	[261]
	USLE	GC-NPD	n.d.	[262]
Agua	LLE	GC-MS	n.d.	[263]
	SPE	GC-MS	n.d.	
	SPME	GC-NPD	0.010-0.025 ng mL ⁻³	[264]
	SPE	GC-NPD	0.005-0.010 ng mL ⁻³	
	LLE	LC-MS	n.d. ng L ⁻³	[255]
	SPE	GC-MS	1 ng L ⁻³	[265]
	LLE	GC-MS	n.d.	[266]
	SPE	LC-MS/MS	n.d.	[267]
	SPE	GC-MS	5 ng L ⁻³	[268]
	SPE	LC-MS/MS	n.d.	[269]
	SPE	GC-MS	n.d.	[270]
Sedimentos	SLE-GPC	GC-FPD	n.d.	[271]
	USLE	LC-MS/MS	0.48-11 µg kg ⁻¹ *	[255]
	MAE-SPE	GC-ICP-MS	2-4 µg kg ⁻¹ *	[272]
	PLE-GPC	GC-MS	0.10-0.16 µg kg ⁻¹ *	[254]
	USLE-SPE	GC-MS	0.03-0.3 µg kg ⁻¹	[273]
	USLE-SPE	GC-MS/MS	1.9-60 µg kg ⁻¹	[274]

n.d.: No descrito

* Límite de cuantificación (LOQ)

Tabla 5.4. cont. Métodos desarrollados para el análisis de OPFRs en diferentes tipos de muestras.

Muestra	Extracción-limpieza	Determinación	LOD	Ref.
Biota	PLE	GC-MS/MS	n.d.	[254]
	MSPD	GC-NPD	0.2-9 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[275]
	PLE	GC-HRMS	0.05-23 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[276]
Polvo domestico	USLE-SPE	GC-MSMS	0.03-0.43 $\mu\text{g g}^{-1}$	[277]
	USLE-GPC	LC-MSMS	10-60 $\mu\text{g kg}^{-1}$ *	[278]
	USLE-SPE	GC-MS/MS	3.8-288 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[274]
Plástico	USLE	GC-MS	180-670 $\mu\text{g g}^{-1}$	[279]
	USLE	LC-MS	0.001-0.002 %	[280]
Lodo	USLE	GC-MS	0.8-3.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[253, 281]
	USLE-SPE	GC-MS/MS	28-575 $\mu\text{g kg}^{-1}$ *	[274]
	MSPD	LC-MS	2-50 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[282]

n.d.: No descrito

* Límite de cuantificación (LOQ)

Para la extracción de sedimentos, se han usado diferentes técnicas como MAE, SLE, PLE o USLE; y la extracción de biota se ha llevado a cabo con mayor frecuencia mediante PLE. Para la extracción de polvo doméstico, plástico o lodo la extracción sólido líquido asistida por ultrasonidos ha sido la técnica más empleada.

En la gran mayoría de los estudios referenciados en la tabla 5.4. se analizan TPHP, TCEP y TCIPP, y en algunos se determina también TDCIPP o TMPP. Los nuevos OPFRs PBDPP y BPA-BDPP se han determinado en polvo doméstico y plásticos [278-280]; sin embargo, no hay ninguna referencia que determine las concentraciones de estos compuestos en el medio ambiente.

5.4.

Desarrollo y validación de un método para la determinación de BPA-BDPP, PBDPP y otros OPFRs en sedimentos y lodos de depuradora

Development of an analysis method for two novel organophosphorus flame retardants in sediment and sewage sludge: resorcinol bis-(diphenylphosphate) (PBDPP) and bisphenol A bis (diphenylphosphate) (BPA-BDPP), including other organophosphate flame retardants and plasticizers

María-Pilar Martínez-Moral¹, Sicco H. Brandsma², Jacob de Boer² and Pim Leonards²

¹Department of Chemistry. University of La Rioja. C/Madre de Dios 51, E-26006. Logroño (La Rioja). Spain.

² Institute for Environmental Studies. VU University Amsterdam. De Boelelaan 1087, 1081 HV Amsterdam. The Netherlands.

5.4. Desarrollo y validación de un método para la determinación de BPA-BDPP, PBDPP y otros OPFRs en sedimentos y lodos de depuradora

A continuación se presenta el trabajo realizado durante la estancia internacional realizada en el *Institute for Environmental Studies (IVM)* en la *VU Universiteit* en Amsterdam bajo la dirección del doctor Pim Leonards. En este trabajo el objetivo principal es desarrollar un método que permita, por primera vez, la determinación de BPA-BDPP y PBDPP junto con otros retardantes de llama organofosforados en sedimentos y lodos de depuradora.

Objetivos

1. Poner a punto un método PLE-SPE-LC-MS/MS para determinar OPFRs en sedimentos y lodos de depuradora, incluyendo los compuestos PBDPP y BPA-BDPP que no habían sido determinados en estas matrices hasta el momento.
2. Comprobar si las señales se ven afectadas de efecto matriz.
3. Caracterizar el método PLE-SPE-HPLC-MS/MS.
4. Realizar el análisis de muestras reales de sedimentos y lodos de depuradora.

Metodología y resultados obtenidos

El trabajo comenzó con el estudio de la estabilidad de los compuestos a determinar: PBDPP, BPA-BDPP, TNBP, TIBP, TCEP, TCIPP, TDCIPP, TBOEP, TPHP, EHDPP, TEHP y TMPP cuando son sometidos a extracción PLE. Para ello, se realizaron extracciones de tierra de diatomeas fortificada con los compuestos. Una vez que se probó que los compuestos no se degradan bajo condiciones PLE, se estudió el tipo de disolvente más apropiado para la extracción de sedimentos. Se realizó la extracción por triplicado de sedimento fortificado con los analitos usando 4 disolventes diferentes: hexano:acetona (3:1), diclorometano: acetona 1:1, metanol:agua (1:1) y acetonitrilo:agua (1:1). Los disolventes con cierta composición acuosa en apariencia eran más limpios, pero se obtuvieron recuperaciones bajas para TPHP, TMPP, PBDPP y BPA-BDPP. Se obtuvieron buenas recuperaciones, por encima del 80 %, usando hexano:acetona 3:1 o diclorometano:acetona 1:1. Para TBOEP la recuperación usando diclorometano: acetona 1:1 es significativamente superior ($p= 0.012$), mientras que para el resto

de compuestos no se aprecian diferencias por lo que este fue el disolvente seleccionado para PLE.

La limpieza de los extractos se realizó mediante extracción en fase sólida. Para ello, los extractos de lodos y de sedimentos fueron evaporados y reconstituidos en una mezcla metanol:agua y se ajustaron a pH = 2.

Se probaron dos tipos de rellenos SPE: Oasis HLB y Oasis MCX. No se observaron diferencias en cuanto a efectividad de la limpieza ni en la retención de los analitos.

A continuación, se estudió la existencia de efecto matriz, comparando la señal obtenida del análisis de muestras fortificadas con extractos fortificados y con la señal correspondiente a disoluciones estándar de la misma concentración. Para TDCIPP, EHDP, TMPP, PBDPP y BPA-BDPP se observó disminución de la señal al analizar las muestras fortificadas. Aunque se añadieron como patrones internos deuterados TPHP-d₁₅ and TNBP-d₂₇, estos no corrigieron el efecto matriz para todos los compuestos. En el momento en el que se realizó este estudio no había disponibilidad en el mercado del resto de compuestos marcados isotópicamente, por lo que se optó por la determinación mediante adición estándar.

El origen de la disminución o del incremento de la señal puede ser debido a disminución de la recuperación por interactuar en mayor medida con la matriz de sedimento o lodo que con la tierra de diatomeas, pérdidas en la etapa de limpieza mediante SPE o bien diferencias en la ionización al realizarse en presencia de otros compuestos. Para intentar solventar en medida de lo posible el efecto matriz, se estudió su origen analizando muestras fortificadas antes de la extracción, que se compararon con las mismas muestras fortificadas tras la extracción previamente a la etapa SPE y con los extractos fortificados tras la SPE, justo antes del análisis LC-MS/MS. Los resultados obtenidos indicaron que la causa del efecto matriz son los cambios de la efectividad de la ionización debidos a interferencias presentes en la matriz en la mayoría de los casos.

El método fue caracterizado en términos de sensibilidad, precisión y exactitud. Se obtuvieron límites de detección entre 0.006 y 0.40 ng g⁻¹ y la precisión intermedia fue menor del 18 % para todos los compuestos. Los valores de recuperación fueron excelentes, del 91 al 108 %, y la desviación estándar relativa es menor al 10 %.

Para finalizar, se analizaron varias muestras reales de sedimentos y lodos de depuradora. Todos los compuestos fueron detectados en las muestras reales,

incluyendo PBDPP y BPA-BDPP. Las concentraciones de estos dos compuestos fueron menores que las del resto de OPFRs analizados.

Conclusiones

1. Se ha desarrollado, validado y aplicado un método PLE-SPE-LC-MS/MS para la determinación de 12 retardantes de llama organofosforados, incluyendo BPA-BDPP y PBDPP, en sedimentos y lodos de depuradora.
2. La mezcla diclorometano:acetona 1:1 proporciona buenas recuperaciones de los compuestos extraídos mediante PLE.
3. Para la limpieza de los extractos mediante SPE, se pueden emplear indistintamente polímeros de fase reversa con grupos hidrofílicos Oasis HLB o cambiadores cationicos Oasis MCX .
4. La determinación de TDCIPP, EHDP, TMPP, PBDPP y BPA-BDPP está afectada por efecto matriz.
5. Se ha determinado el origen de la disminución o el aumento de señal analítica, siendo la presencia de matriz durante la ionización de los compuestos la responsable de los efectos matriz.
6. El método desarrollado aporta recuperaciones de aproximadamente el 100 %, límites de detección menores de 0.40 ng g^{-1} y repetibilidad expresada como DER menor del 10%.
7. Al aplicar el método, se han detectado todos los compuestos estudiados en las muestras de sedimentos y lodos analizadas.
8. Esta es la primera vez que se detectan y determinan PBDPP y BPA-BDPP en este tipo de muestras.

6

Conclusiones / Conclusions



6. CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas en cada uno de los trabajos han sido expuestas en el artículo y en el resumen que precede al artículo científico. A continuación, se enumeran las conclusiones generales obtenidas de la elaboración de esta tesis.

1. La determinación de compuestos disruptores endocrinos es importante para su control y seguimiento en muestras que representan una fuente de exposición para la población y en muestras medioambientales.
2. Mediante la aplicación de las nuevas técnicas de extracción propuestas (SPLE, FUSLE y MEPS) se obtienen importantes mejoras en los métodos de análisis.
3. Se ha demostrado que la extracción con líquidos presurizados (PLE) es muy eficaz para la extracción de BPA, APs y BDEs de lodos, BDEs de polvo doméstico, OPFRs de lodos y sedimentos y para la determinación de PFCs de bolsas de palomitas para microondas.
4. La extracción SPLE puede ser muy ventajosa al evitar realizar una etapa de limpieza, que alarga y encarece los análisis, como se ha demostrado para la determinación de BDEs, APs y BPA en muestras medioambientales (polvo doméstico y lodo de depuradora).
5. La extracción FUSLE se caracteriza por ser rápida, sencilla y económica; y ha dado excelentes resultados para la determinación de BDEs en polvo doméstico y de PFCs en lodos de depuradora. Sin embargo, no es la técnica más adecuada para la determinación de BPA y APs en lodo de depuradora.
6. La limpieza del extracto PLE usando MEPS en línea con GC-MS/MS simplifica el proceso, aumenta la sensibilidad del método, mejora la detección y evita daños y suciedad en el equipo.
7. Los métodos desarrollados, optimizados y validados durante esta tesis mejoran en varios aspectos los previamente descritos para los problemas analíticos escogidos.

CONCLUSIONS

The conclusions obtained from each work have been exposed at the end of the corresponding scientific article. The general conclusions are reported below.

1. The study of the occurrence in the environment and the human exposure to endocrine disruptor compounds (EDCs) is very important.
2. The development of new extraction techniques based methods such as those proposed in this thesis (namely SPLE, FUSLE and MEPS) can significantly improve the analytical procedure.
3. The pressurised liquid extraction technique is very effective for the extraction of BDEs, BPA, APs and OPFRs from environmental samples, such as indoor dust, sewage sludge or sediments and for the extraction of PFCs from microwave popcorn packaging.
4. The use of a sorbent in the extraction cell as selective pressurised liquid extraction is able to avoid the clean-up step before the instrumental analysis of the extracts. This has been shown in this work for the determination of BDEs in indoor dust and the extraction of APs and BPA from sewage sludge.
5. The focused ultrasound solid-liquid extraction is a rapid, simple and economical technique. This technique has provided excellent results for the endocrine disruptors studied (PFCs in sewage sludge and BDEs in indoor dust) but for BPA and APs from sludge samples.
6. The on-line clean-up of PLE extracts by MEPS before GC-MS/MS analysis provides automated extract clean-up that improves detection and protects GC-MS from dirt and a sensitivity enhancement.
7. The developed, optimized and validated methods along this thesis mean an improvement of the previously described methods for the same purpose.

ACRÓNIMOS

AP	Alkylphenol
APEO	Alkylphenolpolyethoxylate
APPI	Atmospheric pressure photolonization
BADGE	Bisphenol A diglycidyl ether
BFDGE	Bisphenol F diglycidyl ether
BBP	Benzyl butyl phthalate
BDE	Brominated diphenyl ether
BDP	Bisphenol A bis (diphenylphosphate)
BFR	Brominated flame retardant
BIN	Barrel insert and needle
BP	Butylphenol
BPA	Bisphenol A
BPA-BDPP	Bisphenol A bis (diphenylphosphate)
BPF	Bisphenol F
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
DBP	Dibutylphthalate
DDE	Dichlorodipenyldichloroethylene
DEHP	Diethylhexylphthalate
DDT	Dichlorodiphenyltrichloroethane
DiNP	Diisononyl phthalate
DLLME	Dispersive liquid-liquid microextraction
ECD	Electron capture detection
EDAR	Estación depuradora de aguas residuales
EDC	Endocrine disruptor compound
EHDPP	2-Ethylhexyl diphenyl phosphate
FC	Flash chromatography
FD	Fluorescence detection
FTOH	Fluorotelómeros
FPD	Flame photometric detection
FUSLE	Focused ultrasound solid-liquid extraction
GC	Gas chromatography
GPC	Gel permeation chromatography
HBCDD	Hexabromocyclododecane
HCB	Hexachlorobenzene
HFFR	Halogen free flame retardant
HR	High resolution
HS-SPME	Head space solid-phase microextraction
HpP	Heptylphenol
HxP	Hexylphenol
IPM	Ion pair exchange method

LC	Liquid chromatography
LLE	Liquid-liquid extraction
LPME	Liquid phase microextraction
LVI	Large volume injection
MAE	Microwave assisted extraction
MEPS	Microextraction by packed sorbents
MRM	Multiple reaction monitoring
MS	Mass spectrometry
MSPD	Matrix solid phase dispersion
MTBSTFA	N-methyl-N-tert-butyltrimethylsilyltrifluoroacetamide
NCI	Negative chemical ionisation
NI	Negative ionisation
NSAID	Non-steroidal anti-inflammatory drugs
NP	Nonylphenol
NPD	Nitrogen phosphorous detector
NSAID	Non-steroidal anti-inflammatory drugs
OP	Octylphenol
OPFR	Organo phosphate flame retardant
PAP	Polyfluoroalkyl phosphate surfactant
PBB	Polybrominated biphenyls
PBDE	Polybrominated diphenyl ether
PBDPP	1,3-Phenylene Bis (diphenyl phosphate); Resorcinol bis (diphenylphosphate)
PCDD	Polychlorinated dibenzodioxin
PCB	Polychlorinated biphenyl
PCDF	Polychlorinated dibenzofurans
PE	Phtalate ester
PFB-Br	Pentafluorobenzyl bromide
PFC	Perfluorinated compound
PFCA	Perfluorinated carboxylic acid
PFOA	Perfluorooctanoic acid
PFOS	Perfluorooctanesulfonic acid
PLE	Pressurised liquid extraction
PP	Pentylphenol
REACH	Registration, evaluation, authorisation and restriction of chemicals
RDP	Resorcinol bis (diphenylphosphate)
SAT	Sulfuric acid treatment
SBSE	Stir bar sorptive extraction
SCCP	Short chain chlorinated paraffin
SFE	Supercritical fluid extraction
SFOME	Solidification of floating organic drop microextraction
SPE	Solid-phase extraction
SPLE	Selective pressurised liquid extraction
SPME	Solid-phase microextraction
SSRI	Selective serotonin reuptake inhibitors

TBOEP	Tris(2-butoxyethyl)phosphate
tBP	Tertbutylphenol
TCEP	Tris(2-chloroethyl)phosphate
TCIPP	Tris(2-chloroisopropyl)phosphate
TCP	Tris(cresyl)phosphate; Tris(methylphenyl) phosphate
TDCIPP	Tris(1,3-dichloroisopropyl)phosphate
TEHP	Tris(2-ethylhexyl)phosphate
TIBP	Tris(isobutyl) phosphate
TMPP	Tris(methylphenyl) phosphate
TNBP	Tris(n-butyl) phosphate
TPHP	Tris(phenyl) phosphate
tOP	Tertoctylphenol
USLE	Ultrasound solid-liquid extraction
USAEME	Ultrasound assisted emulsification microextraction
VCE	Vesicular coervative extraction

BIBLIOGRAFÍA

- [1] WHO and UNEP, State of the science of Endocrine Disrupting Chemicals. 2012.
- [2] Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC. Official Journal of the European Community, L309/1.
- [3] Regulation (COM 2009/267) of the European Parliament and of the Council of 12th June 2009 replacing Directive 98/8/EC concerning the placing of biocidal products on the market. Official Journal of the European Community, L276.
- [4] Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18th December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC. Official Journal of the European Union, L396/1.
- [5] <http://www.epa.gov/oppt/existingchemicals/pubs/actionplans/pbde.html>
- [6] T.T. Schug, A. Janesick, B. Blumberg, J.J. Heindel, J. Steroid Biochem. Molecular Biology 127 (2011) 204.
- [7] M. Boas, U. Feldt-Rasmussen, K.M. Main, Molecular and Cellular Endocrinology 355 (2012) 240.
- [8] C. Frye, E. Bo, G. Calamandrei, L. Calzà, F. Dessì-Fulgheri, M. Fernández, L. Fusani, O. Kah, M. Kajta, Y. Le Page, H.B. Patisaul, A. Venerosi, A.K. Wojtowicz, G.C. Panzica, Journal of Neuroendocrinology 24 (2012) 144.
- [9] B.E. Richter, B.A. Jones, J.L. Ezzell, N.L. Porter, N. Avdalovic, C. Pohl, Analytical Chemistry 68 (1996) 1033.
- [10] E. Björklund, T. Nilsson, S. Bøwadt, TrAC - Trends in Analytical Chemistry 19 (2000) 434.
- [11] A. Nieto, F. Borrull, E. Pocurull, R.M. Marcé, TrAC - Trends in Analytical Chemistry 29 (2010) 752.
- [12] M.M. Schantz, Analytical and Bioanalytical Chemistry 386 (2006) 1043.
- [13] R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, P. Revilla-Ruiz, J. Hernández-Méndez, Journal of Chromatography A 1089 (2005) 1.
- [14] M. Nording, S. Sporning, K. Wiberg, E. Björklund, P. Haglund, Analytical and Bioanalytical Chemistry 381 (2005) 1472.
- [15] A. Müller, E. Björklund, C. Von Holst, Journal of Chromatography A 925 (2001) 197.
- [16] J.J. Ramos, C. Dietz, M.J. González, L. Ramos, Journal of Chromatography A 1152 (2007) 254.
- [17] A. Gentili, D. Perret, S. Marchese, M. Sergi, C. Olmi, R. Curini, Journal of Agricultural and Food Chemistry 52 (2004) 4614.
- [18] J.L. Gómez-Ariza, M. Bujalance, I. Giráldez, A. Velasco, E. Morales, Journal of Chromatography A 946 (2002) 209.
- [19] J. Poerschmann, R. Carlson, Journal of Chromatography A 1127 (2006) 18.

- [20] E. Björklund, A. Muller, C. von Holst, *Analytical Chemistry* 73 (2001) 4050.
- [21] J. Malavia, F.J. Santos, M.T. Galceran, *Talanta* 84 (2011) 1155.
- [22] R. Ghosh, K.J. Hageman, E. Björklund, *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 7242.
- [23] E.M. Robinson, S.J. Trumble, B. Subedi, R. Sanders, S. Usenko, *Journal of Chromatography A* 1319 (2013) 14.
- [24] M.I. Pinto, C. Micaelo, C. Vale, G. Sontag, J.P. Noronha, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* (2014).
- [25] N. Salgueiro-González, I. Turnes-Carou, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez, *Journal of Chromatography A* 1270 (2012) 80.
- [26] Z. Zhang, E. Ohiozebau, S.M. Rhind, *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 1203.
- [27] I. Kania-Korwel, H. Zhao, K. Norstrom, X. Li, K.C. Hornbuckle, H.-. Lehmler, *Journal of Chromatography A* 1214 (2008) 37.
- [28] J.L. Gómez-Ariza, T. García-Barrera, F. Lorenzo, A.G. González, *Analytica Chimica Acta* 540 (2005) 17.
- [29] A. Hussen, R. Westbom, N. Megersa, L. Mathiasson, E. Björklund, *Journal of Chromatography A* 1152 (2007) 247.
- [30] Z. Zhang, S.M. Rhind, C. Kerr, M. Osprey, C.E. Kyle, *Analytica Chimica Acta* 685 (2011) 29.
- [31] L. Do, S. Lundstedt, P. Haglund, *Chemosphere* 90 (2013) 2414.
- [32] J.B. Quintana, R. Rodil, P. López-Mahía, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodríguez, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 388 (2007) 1283.
- [33] M.P. Martínez, J.D. Carrillo, M.T. Tena, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397 (2010) 257.
- [34] M.P. Martínez-Moral, M.T. Tena, *Journal of Separation Science* 34 (2011) 2513.
- [35] H. Miguel-Santos, C. Lodeiro, J.L. Capelo-Martínez, *Ultrasound in Chemistry*. Wiley-VCH, Germany, 2009.
- [36] I. Zabaleta, E. Bizkarguenaga, A. Iparragirre, P. Navarro, A. Prieto, L.T. Fernández, O. Zuloaga, *Journal of Chromatography A* 1331 (2014) 27.
- [37] P. Navarro, J. Bustamante, A. Vallejo, A. Prieto, A. Usobiaga, S. Arrasate, E. Anakabe, E. Puy-Azurmendi, O. Zuloaga, *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 5890.
- [38] E. Bizkarguenaga, A. Iparragirre, I. Zabaleta, A. Vallejo, L.A. Fernández, A. Prieto, O. Zuloaga, *Talanta* 119 (2014) 53.
- [39] C. Moreta, M.T. Tena, *Journal of Chromatography A* 1302 (2013) 88.
- [40] C. Moreta, M.T. Tena, *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 3392.
- [41] D. Pérez-Palacios, M.A. Fernández-Recio, C. Moreta, M.T. Tena, *Talanta* 99 (2012) 167.
- [42] M.P. Martínez-Moral, M.T. Tena, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 404 (2012) 289.
- [43] M.P. Martínez-Moral, M.T. Tena, *Talanta* 109 (2013) 197.
- [44] A. Errekato, A. Prieto, O. Zuloaga, A. Usobiaga, N. Etxebarria, L.A. Fernández, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 392 (2008) 1471.
- [45] J.L. Capelo, M.M. Galesio, G.M. Felisberto, C. Vaz, J.C. Pessoa, *Talanta* 66 (2005) 1272.
- [46] J.E. Araújo, E. Oliveira, A. Otero-Glez, J. Santos Nores, G. Igrejas, C. Lodeiro, J.L. Capelo, H.M. Santos, *Talanta* 119 (2014) 90.
- [47] M. Abdel-Rehim, *Journal of Chromatography B* 801 (2004) 317.

- [48] M. Abdel-Rehim, *Analytica Chimica Acta* 701 (2011) 119.
- [49] M. Abdel-Rehim, *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 2569.
- [50] J. Pereira, J.S. Câmara, A. Colmsjö, M. Abdel-Rehim, *Biomedical Chromatography* 28 (2014) 839.
- [51] A.M. Casas Ferreira, M.E. Fernández Laespada, J.L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, *Journal of Chromatography A* 1318 (2013) 35.
- [52] A. Prieto, A. Vallejo, O. Zuloaga, A. Paschke, B. Sellergen, E. Schillinger, S. Schrader, M. Möder, *Analytica Chimica Acta* 703 (2011) 41.
- [53] A. Prieto, S. Schrader, C. Bauer, M. Möder, *Analytica Chimica Acta* 685 (2011) 146.
- [54] A. Prieto, S. Schrader, M. Moeder, *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 6002.
- [55] A. El-Beqqali, A. Kussak, M. Abdel-Rehim, *Journal of Chromatography A* 1114 (2006) 234.
- [56] G.G. Noche, M.E.F. Laespada, J.L.P. Pavón, B.M. Cordero, S.M. Lorenzo, *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 9390.
- [57] I. González-Mariño, J.B. Quintana, I. Rodríguez, S. Schrader, M. Moeder, *Analytica Chimica Acta* 684 (2011) 50.
- [58] M. Moeder, S. Schrader, U. Winkler, R. Rodil, *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 2925.
- [59] M.D.N. Sánchez, P.M. Santos, C.P. Sappó, J.L.P. Pavón, B.M. Cordero, *Talanta* 119 (2014) 375.
- [60] C. García Pinto, A. Pérez Antón, J.L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, *Journal of Chromatography A* 1260 (2012) 200.
- [61] J. Gonçalves, B. Mendes, C.L. Silva, J.S. Câmara, *Journal of Chromatography A* 1229 (2012) 13.
- [62] P. Guerra, E. Eljarrat, D. Barceló, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 30 (2011) 842.
- [63] D. Wang, Q.X. Li, *Mass Spectrometry Reviews* 29 (2010) 737.
- [64] S.C. Cunha, K. Kalachova, J. Pulkrabova, J.O. Fernandes, M.B.P.P. Oliveira, A. Alves, J. Hajslova, *Chemosphere* 78 (2010) 1263.
- [65] G.-. Hu, J.-. Dai, Z.-. Xu, X.-. Luo, H. Cao, J.-. Wang, B.-. Mai, M.-. Xu, *Environment International* 36 (2010) 309.
- [66] L.G. Costa, G. Giordano, *Neurotoxicology* 28 (2007) 1047.
- [67] J.K. Huwe, H. Hakk, L.S. Birnbaum, *Environmental Science and Technology* 42 (2008) 7018.
- [68] G. Giordano, T.J. Kavanagh, L.G. Costa, *Toxicology and Applied Pharmacology* 232 (2008) 161.
- [69] J.K. Huwe, H. Hakk, D.J. Smith, J.J. Diliberto, V. Richardson, H.M. Stapleton, L.S. Birnbaum, *Environmental Science and Technology* 42 (2008) 2694.
- [70] G. Giordano, T.J. Kavanagh, L.G. Costa, *Neurotoxicology* 30 (2009) 326.
- [71] S. Hallgren, P.O. Darnerud, *Toxicology* 177 (2002) 227.
- [72] T.E. Stoker, S.C. Laws, K.M. Crofton, J.M. Hedge, J.M. Ferrell, R.L. Cooper, *Toxicological Sciences* 78 (2004) 144.
- [73] P. Eriksson, H. Viberg, E. Jakobsson, U. Örn, A. Fredriksson, *Toxicological Sciences* 67 (2002) 98.
- [74] H. Viberg, A. Fredriksson, E. Jakobsson, U. Örn, P. Erikson, *Toxicological Sciences* 76 (2003) 112.
- [75] T.A. McDonald, *Chemosphere* 46 (2002) 745.
- [76] M. Polo, G. Gómez-Noya, J.B. Quintana, M. Llompart, C. García-Jares, R. Cela, *Analytical Chemistry* 76 (2004) 1054.

- [77] T.A. McDonald, *Integrated Environmental Assessment and Management* 1 (2005) 343.
- [78] A. Covaci, S. Voorspoels, L. Roosens, W. Jacobs, R. Blust, H. Neels, *Chemosphere* 73 (2008) 170.
- [79] H.A. Anderson, P. Imm, L. Knobeloch, M. Turyk, J. Mathew, C. Buelow, V. Persky, *Chemosphere* 73 (2008) 187.
- [80] L.-L. Toms, F. Harden, O. Paepke, P. Hobson, J.J. Ryan, J.F. Mueller, *Environmental Science and Technology* 42 (2008) 7510.
- [81] A. Covaci, S. Voorspoels, *Journal of Chromatography B* 827 (2005) 216.
- [82] Q. Xiao, B. Hu, J. Duan, M. He, W. Zu, *J. American Society for Mass Spectrometry* 18 (2007) 1740.
- [83] H. Liu, M. Zhang, X. Wang, Y. Zou, W. Wang, M. Ma, Y. Li, H. Wang, *Microchimica Acta* 176 (2012) 303.
- [84] S. Lacorte, M. Guillamon, *Chemosphere* 73 (2008) 70.
- [85] L. Zhu, B. Ma, J. Li, Y. Wu, J. Gong, *Chemosphere* 74 (2009) 1429.
- [86] J.L. Tadeo, C. Sánchez-Brunete, E. Miguel, *Talanta* 78 (2009) 138.
- [87] E. Eljarrat, G. Marsh, A. Labandeira, D. Barceló, *Chemosphere* 71 (2008) 1079.
- [88] B. Rocha-Gutierrez, W.-. Lee, *Water, Air, & Soil Pollution* 224 (2013).
- [89] M. Gorga, E. Martínez, A. Ginebreda, E. Eljarrat, D. Barceló, *Science of the Total Environment* 444 (2013) 51.
- [90] B. Clarke, N. Porter, R. Symons, P. Marriott, P. Ades, G. Stevenson, J. Blackbeard, *Chemosphere* 73 (2008) 980.
- [91] R.J. Law, C.R. Allchin, J. de Boer, A. Covaci, D. Herzke, P. Lepom, S. Morris, J. Tronczynski, C.A. de Wit, *Chemosphere* 64 (2006) 187.
- [92] M.P. Martinez-Moral, M.T. Tena, *Journal of Chromatography A*(2014) .
- [93] T. Kupper, L.F. de Alencastro, R. Gatsigazi, R. Furrer, D. Grandjean, J. Tarradellas, *Chemosphere* 71 (2008) 1173.
- [94] K.D. North, *Environmental Science and Technology* 38 (2004) 4484.
- [95] R.C. Hale, M. Alaei, J.B. Manchester-Neesvig, H.M. Stapleton, M.G. Ikonou, *Environment International* 29 (2003) 771.
- [96] J.G. Allen, M.D. McClean, H.M. Stapleton, T.F. Webster, *Environment International* 34 (2008) 1085.
- [97] H.-. Hwang, E.-. Park, T.M. Young, B.D. Hammock, *Science of the Total Environment* 404 (2008) 26.
- [98] H.A. Jones-Otazo, J.P. Clarke, M.L. Diamond, J.A. Archbold, G. Ferguson, T. Harner, G.M. Richardson, J.J. Ryan, B. Wilford, *Environmental Science and Technology* 39 (2005) 5121.
- [99] A. Sjödin, O. Päpke, E. McGahee, J.-. Focant, R.S. Jones, T. Pless-Mulloli, L.-.L. Toms, T. Herrmann, J. Müller, L.L. Needham, D.G. Patterson Jr., *Chemosphere* 73 (2008) S131.
- [100] H. Stuart, C. Ibarra, M.A.-. Abdallah, R. Boon, H. Neels, A. Covaci, *Environment International* 34 (2008) 1170.
- [101] N. Wu, T. Herrmann, O. Paepke, J. Tickner, R. Hale, E. Harvey, M. La Guardia, M.D. McClean, T.F. Webster, *Environmental Science and Technology* 41 (2007) 1584.
- [102] K. Thuresson, J.A. Björklund, C.A. de Wit, *Science of the Total Environment* 414 (2012) 713.
- [103] W. D'Hollander, L. Roosens, A. Covaci, C. Cornelis, H. Reynders, K.V. Campenhout, P.D. Voogt, L. Bervoets, *Chemosphere* 81 (2010) 478.

- [104] S. Harrad, C. Ibarra, M. Diamond, L. Melymuk, M. Robson, J. Douwes, L. Roosens, A.C. Dirtu, A. Covaci, *Environment International* 34 (2008) 232.
- [105] J. Tan, S.M. Cheng, A. Loganath, Y.S. Chong, J.P. Obbard, *Chemosphere* 66 (2007) 985.
- [106] M.P. Martínez-Moral, M.T. Tena, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 404 (2012) 289.
- [107] A. Covaci, J. De Boer, J.J. Ryan, S. Voorspoels, P. Schepens, *Analytical Chemistry* 74 (2002) 790.
- [108] C. Pirard, E. De Pauw, J.-. Focant, *Journal of Chromatography A* 998 (2003) 169.
- [109] P. Serôdio, M.S. Cabral, J.M.F. Nogueira, *Journal of Chromatography A* 1141 (2007) 259.
- [110] M.P. Martínez, J.D. Carrillo, M.T. Tena, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397 (2010) 257.
- [111] F.C. Calvosa, A.F. Lagalante, *Talanta* 80 (2010) 1116.
- [112] A.F. Lagalante, T.D. Oswald, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391 (2008) 2249.
- [113] J. Regueiro, M. Llompart, C. Garcia-Jares, R. Cela, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 388 (2007) 1095.
- [114] H.M. Stapleton, T. Harner, M. Shoeib, J.M. Keller, M.M. Schantz, S.D. Leigh, S.A. Wise, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 384 (2006) 791.
- [115] J. Regueiro, M. Llompart, C. García-Jares, R. Cela, *Journal of Chromatography A* 1137 (2006) 1.
- [116] H.M. Stapleton, N.G. Dodder, J.H. Offenber, M.M. Schantz, S.A. Wise, *Environmental Science and Technology* 39 (2005) 925.
- [117] D. Wang, S. Atkinson, A. Hoover-Miller, W.L. Shelver, Q.X. Li, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22 (2008) 647.
- [118] N. Van den Eede, A.C. Dirtu, N. Ali, H. Neels, A. Covaci, *Talanta* (2011) .
- [119] Y. Li, T. Wang, Y. Hashi, H. Li, J.-. Lin, *Talanta* 78 (2009) 1429.
- [120] X. Liu, J. Li, Z. Zhao, W. Zhang, K. Lin, C. Huang, X. Wang, *Journal of Chromatography A* 1216 (2009) 2220.
- [121] A.R. Fontana, R.G. Wuilloud, L.D. Martínez, J.C. Altamirano, *Journal of Chromatography A* 1216 (2009) 147.
- [122] S. Lacorte, M.G. Ikonou, M. Fischer, *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 337.
- [123] R. Montes, I. Rodríguez, R. Cela, *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 14.
- [124] C. Salgado-Petinal, M. Garcia-Chao, M. Llompart, C. Garcia-Jares, R. Cela, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 385 (2006) 637.
- [125] A. De La Cal, E. Eljarrat, D. Barceló, *Journal of Chromatography A* 1021 (2003) 165.
- [126] J. De Boer, C. Allchin, R. Law, B. Zegers, J.P. Boon, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 20 (2001) 591.
- [127] N.B. Lana, P. Berton, A. Covaci, A.G. Atencio, N.F. Ciocco, J.C. Altamirano, *Journal of Chromatography A* 1285 (2013) 15.
- [128] E. Eljarrat, A. De La Cal, D. Larrazabal, B. Fabrellas, A.R. Fernandez-Alba, F. Borrull, R.M. Marce, D. Barcelo, *Environmental Pollution* 136 (2005) 493.
- [129] S.N. Zhou, E.J. Reiner, C. Marvin, T. Kolic, N. Riddell, P. Helm, F. Dorman, M. Misselwitz, I.D. Brindle, *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 633.
- [130] J. Wang, Y.-. Ma, S.-. Chen, M. Tian, X.-. Luo, B.-. Mai, *Environment International* 36 (2010) 535.
- [131] S. Losada, F.J. Santos, M.T. Galceran, *Talanta* 80 (2009) 839.

- [132] T. Xu, I.K. Cho, D. Wang, F.M. Rubio, W.L. Shelver, A.M.E. Gasc, J. Li, Q.X. Li, *Environmental Pollution* 157 (2009) 417.
- [133] C. Sánchez-Brunete, E. Miguel, J.L. Tadeo, *Journal of Separation Science* 32 (2009) 109.
- [134] M. Shin, M.L. Svoboda, P. Falletta, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387 (2007) 2923.
- [135] G. Mascolo, V. Locaputo, G. Mininni, *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 4601.
- [136] B. Gómara, C. García-Ruiz, M.J. González, M.L. Marina, *Analytica Chimica Acta* 565 (2006) 208.
- [137] O. Wurl, J.R. Potter, C. Durville, J.P. Obbard, *Atmospheric Environment* 40 (2006) 5558.
- [138] M.J. La Guardia, R.C. Hale, E. Harvey, *Environmental Science and Technology* 40 (2006) 6247.
- [139] D. Larrazábal, M.Á. Martínez, E. Eljarrat, D. Barceló, B. Fabrellas, *Journal of Mass Spectrometry* 39 (2004) 1168.
- [140] M.I.H. Helaleh, S. Fujii, T. Korenaga, *Talanta* 54 (2001) 1039.
- [141] R. Liu, J.L. Zhou, A. Wilding, *Journal of Chromatography A* 1022 (2004) 179.
- [142] B. Shao, H. Han, J. Hu, J. Zhao, G. Wu, Y. Xue, Y. Ma, S. Zhang, *Analytica Chimica Acta* 530 (2005) 245.
- [143] B. Shao, H. Han, X. Tu, L. Huang, *Journal of Chromatography B* 850 (2007) 412.
- [144] Y. Liu, X. Dai, J. Wei, *Journal of Environmental Sciences (China)* 25 (2013) 1662.
- [145] R. Renner, - *Environmental Science & Technology* (1997) - 316A.
- [146] J. Gasperi, S. Garnaud, V. Rocher, R. Moilleron, *Science of the Total Environment* 407 (2008) 263.
- [147] J. Sánchez-Avila, J. Bonet, G. Velasco, S. Lacorte, *Science of the Total Environment* 407 (2009) 4157.
- [148] F. Michelangeli, O.A. Ogunbayo, L.L. Wootton, P.F. Lai, F. Al-Mousa, R.M. Harris, R.H. Waring, C.J. Kirk, *Chemico-Biological Interactions* 176 (2008) 220.
- [149] E. Puy-Azurmendi, A. Olivares, A. Vallejo, M. Ortiz-Zarragoitia, B. Piña, O. Zuloaga, M.P. Cajaraville, *Science of the Total Environment* 466-467 (2014) 1.
- [150] E.-. Ko, K.-. Kim, S.-. Kang, S.-. Kim, S.-. Bang, S.-. Hamm, D.-. Kim, *Talanta* 73 (2007) 674.
- [151] S. Esteban, M. Gorga, M. Petrovic, S. González-Alonso, D. Barceló, Y. Valcárcel, *Science of the Total Environment* 466-467 (2014) 939.
- [152] J.-. Lin, R. Arunkumar, C.-. Liu, *Journal of Chromatography A* 840 (1999) 71.
- [153] G. Shen, G. Yu, Z. Cai, Z. Zhang, *Chinese Science Bulletin* 50 (2005) 2681.
- [154] Y. Nie, Z. Qiang, H. Zhang, C. Adams, *Journal of Chromatography A* 1216 (2009) 7071.
- [155] M. Petrovic, A. Diaz, F. Ventura, D. Barceló, *Analytical Chemistry* 73 (2001) 5886.
- [156] M. Fernández-Sanjuan, A. Rigol, A. Sahuquillo, S. Rodríguez-Cruz, S. Lacorte, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 394 (2009) 1525.
- [157] M. Petrovic, D. Barceló, A. Diaz, F. Ventura, *Journal of The American Society for Mass Spectrometry* 14 (2003) 516.
- [158] B. Shao, H. Han, J. Hu, J. Zhao, G. Wu, Y. Xue, Y. Ma, S. Zhang, *Analytica Chimica Acta* 530 (2005) 245.
- [159] X. Li, G.-. Ying, H.-. Su, X.-. Yang, L. Wang, *Environment International* 36 (2010) 557.
- [160] M.I.H. Helaleh, Y. Takabayashi, S. Fujii, T. Korenaga, *Analytica Chimica Acta* 428 (2001) 227.
- [161] M.I.H. Helaleh, K. Tanaka, S.-. Fujii, T. Korenaga, *Analytical Sciences* 17 (2001) 1225.
- [162] D. Li, J. Park, J.-. Oh, *Analytical Chemistry* 73 (2001) 3089.

- [163] B.L.L. Tan, M.A. Mohd, *Talanta* 61 (2003) 385.
- [164] C. Basheer, H.K. Lee, *Journal of Chromatography A* 1057 (2004) 163.
- [165] Z. Xie, J. Selzer, R. Ebinghaus, A. Caba, W. Ruck, *Analytica Chimica Acta* 565 (2006) 198.
- [166] O. Ballesteros, A. Zafra, A. Navalón, J.L. Vílchez, *Journal of Chromatography A* 1121 (2006) 154.
- [167] Y. Wang, W. Hu, Z. Cao, X. Fu, T. Zhu, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 383 (2005) 857.
- [168] Z. Yu, S. Peldszus, P.M. Huck, *Journal of Chromatography A* 1148 (2007) 65.
- [169] C. Sánchez-Brunete, E. Miguel, J.L. Tadeo, *Journal of Chromatography A* 1216 (2009) 5497.
- [170] M. Naassner, M. Mergler, K. Wolf, I. Schuphan, *Journal of Chromatography A* 945 (2002) 133.
- [171] H. Sabik, F. Gagné, C. Blaise, D.J. Marcogliese, R. Jeannot, *Chemosphere* 51 (2003) 349.
- [172] J.-. Baugros, C. Cren-Olivé, B. Giroud, J.-. Gauvrit, P. Lantéri, M.-. Grenier-Loustalot, *Journal of Chromatography A* 1216 (2009) 4941.
- [173] T. Tsuda, A. Takino, M. Kojima, H. Harada, K. Muraki, M. Tsuji, *Chemosphere* 41 (2000) 757.
- [174] M. Petrovic, S. Lacorte, P. Viana, D. Barceló, *Journal of Chromatography A* 959 (2002) 15.
- [175] R. Liu, J.L. Zhou, A. Wilding, *Journal of Chromatography A* 1038 (2004) 19.
- [176] O. Pardo, V. Yusà, N. León, A. Pastor, *Journal of Chromatography A* 1107 (2006) 70.
- [177] X. Peng, Z. Wang, C. Yang, F. Chen, B. Mai, *Journal of Chromatography A* 1116 (2006) 51.
- [178] V. Andreu, E. Ferrer, J.L. Rubio, G. Font, Y. Picó, *Science of the Total Environment* 378 (2007) 124.
- [179] R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, P. Revilla-Ruiz, *Journal of Chromatography A* 1137 (2006) 207.
- [180] F. Zhou, L. Zhang, A. Liu, Y. Shen, J. Yuan, X. Yu, X. Feng, Q. Xu, C. Cheng, *Journal of Chromatography B* 938 (2013) 80.
- [181] J.R. Rochester, *Reproductive Toxicology* 42 (2013) 132.
- [182] J.-. Kang, D. Aasi, Y. Katayama, *Crit. Reviews in Toxicology* 37 (2007) 607.
- [183] H.-. Lee, T.E. Peart, *Journal of AOAC International* 83 (2000) 290.
- [184] G. Gatidou, N.S. Thomaidis, A.S. Stasinakis, T.D. Lekkas, *Journal of Chromatography A* 1138 (2007) 32.
- [185] P. Guerra, E. Eljarrat, D. Barceló, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397 (2010) 2817.
- [186] C. Nerín, M.R. Philo, J. Salafranca, L. Castle, *Journal of Chromatography A* 963 (2002) 375.
- [187] P. Viñas, N. Campillo, N. Martínez-Castillo, M. Hernández-Córdoba, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397 (2010) 115.
- [188] A. Zafra, M. Del Olmo, B. Suárez, E. Hontoria, A. Navalón, J.L. Vílchez, *Water Research* 37 (2003) 735.
- [189] M.D. Hernando, M. Mezcua, M.J. Gómez, O. Malato, A. Agüera, A.R. Fernández-Alba, *Journal of Chromatography A* 1047 (2004) 129.
- [190] H. Gallart-Ayala, E. Moyano, M.T. Galceran, *Analytica Chimica Acta* 683 (2011) 227.
- [191] R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, P. Revilla-Ruiz, *Journal of Chromatography A* 1137 (2006) 207.
- [192] J.L. Vílchez, A. Zafra, A. González-Casado, E. Hontoria, M. Del Olmo, *Analytica Chimica Acta* 431 (2001) 31.
- [193] F.-. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Journal of Chromatography A* 1163 (2007) 269.

- [194] A. Zafra, M. Del Olmo, R. Pulgar, A. Navalón, J.L. Vilchez, *Chromatographia* 56 (2002) 213.
- [195] W. Völkel, M. Kiranoglu, H. Fromme, *Toxicology Letters* 179 (2008) 155.
- [196] M.Z. Lacroix, S. Puel, S.H. Collet, T. Corbel, N. Picard-Hagen, P. Toutain, C. Viguié, V. Gayrard, *Talanta* 85 (2011) 2053.
- [197] J.C. D'Eon, S.A. Mabury, *Environmental Science and Technology* 41 (2007) 4799.
- [198] J.W. Martin, S.A. Mabury, P.J. O'Brien, *Chemico-Biological Interactions* 155 (2005) 165.
- [199] W.J. Fasano, S.C. Carpenter, S.A. Gannon, T.A. Snow, J.C. Stadler, G.L. Kennedy, R.C. Buck, S.H. Korzeniowski, P.M. Hinderliter, R.A. Kemper, *Toxicological Sciences* 91 (2006) 341.
- [200] M.E. Andersen, J.L. Butenhoff, S.-. Chang, D.G. Farrar, G.L. Kennedy Jr., C. Lau, G.W. Olsen, J. Seed, K.B. Wallace, *Toxicological Sciences* 102 (2008) 3.
- [201] N. Kudo, N. Bandai, Y. Kawashima, *Toxicology Letters* 99 (1998) 183.
- [202] S.A. Tittlemier, E. Braekevelt, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 399 (2011) 221.
- [203] Y. Chang, W. Chen, F. Bai, P. Chen, G. Wang, C. Chen, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*(2011) 1.
- [204] A. Ballesteros-Gómez, S. Rubio, S. van Leeuwen, *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 5913.
- [205] S. Dolman, M. Pelzing, *Journal of Chromatography B* 879 (2011) 2043.
- [206] G. Lv, L. Wang, S. Liu, S. Li, *Analytical Sciences* 25 (2009) 425.
- [207] X. Trier, K. Granby, J.H. Christensen, *Environmental Science and Pollution Research* 18 (2011) 1108.
- [208] B.S. Larsen, M.A. Kaiser, M. Botelho, G.R. Wooler, L.W. Buxton, *Analyst* 130 (2005) 59.
- [209] E. Sinclair, S.K. Kim, H.B. Akinleye, K. Kannan, *Environmental Science and Technology* 41 (2007) 1180.
- [210] X. Liu, K. Krebs, Z. Guo, N. Roache, *Journal of Chromatography A* 1216 (2009) 3910.
- [211] S.P.J. Van Leeuwen, A. Karrman, B. Van Bavel, J. De Boer, G. Lindstrom, *Environmental Science and Technology* 40 (2006) 7854.
- [212] L.W.Y. Yeung, S. Taniyasu, K. Kannan, D.Z.Y. Xu, K.S. Guruge, P.K.S. Lam, N. Yamashita, *Journal of Chromatography A* 1216 (2009) 4950.
- [213] C.-. Tseng, L.-. Liu, C.-. Chen, W.-. Ding, *Journal of Chromatography A* 1105 (2006) 119.
- [214] M. Houde, J.W. Martin, R.J. Letcher, K.R. Solomon, D.C.G. Muir, *Environmental Science and Technology* 40 (2006) 3463.
- [215] M. Villagrasa, M. López De Alda, D. Barceló, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 386 (2006) 953.
- [216] R. Alzaga, J.M. Bayona, *Journal of Chromatography A* 1042 (2004) 155.
- [217] R. Alzaga, C. Salgado-Petinal, E. Jover, J.M. Bayona, *Journal of Chromatography A* 1083 (2005) 1.
- [218] V. Dufková, R. Čabala, D. Maradová, M. Štícha, *Journal of Chromatography A* 1216 (2009) 8659.
- [219] C.A. Moody, J.A. Field, *Environmental Science and Technology* 34 (2000) 3864.
- [220] J.W. Martin, D.C.G. Muir, C.A. Moody, D.A. Ellis, C.K. Wai, K.R. Solomon, S.A. Mabury, *Analytical Chemistry* 74 (2002) 584.
- [221] A. Dreyer, C. Temme, R. Sturm, R. Ebinghaus, *Journal of Chromatography A* 1178 (2008) 199.
- [222] M. Takino, S. Daishima, T. Nakahara, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 17 (2003) 383.
- [223] M.K. So, S. Taniyasu, N. Yamashita, J.P. Giesy, J. Zheng, Z. Fang, S.H. Im, P.K.S. Lam, *Environmental Science and Technology* 38 (2004) 4056.

- [224] N. Yamashita, K. Kannan, S. Taniyasu, Y. Horii, T. Okazawa, G. Petrick, T. Gamo, *Environmental Science and Technology* 38 (2004) 5522.
- [225] S. Taniyasu, K. Kannan, K.S. Man, A. Gulkowska, E. Sinclair, T. Okazawa, N. Yamashita, *Journal of Chromatography A* 1093 (2005) 89.
- [226] K.J. Hansen, H.O. Johnson, J.S. Eldridge, J.L. Butenhoff, L.A. Dick, *Environmental Science and Technology* 36 (2002) 1681.
- [227] B. Boulanger, J.D. Vargo, J.L. Schnoor, K.C. Hornbuckle, *Environmental Science and Technology* 39 (2005) 5524.
- [228] X. Esparza, E. Moyano, J. De Boer, M.T. Galceran, S.P.J. Van Leeuwen, *Talanta* 86 (2011) 329.
- [229] M.M. Schultz, D.F. Barofsky, J.A. Field, *Environmental Science and Technology* 40 (2006) 289.
- [230] C.P. Higgins, J.A. Field, C.S. Criddle, R.G. Luthy, *Environmental Science and Technology* 39 (2005) 3946.
- [231] H.F. Schröder, *Journal of Chromatography A* 1020 (2003) 131.
- [232] M. Llorca, M. Farré, Y. Picó, D. Barceló, *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 4840.
- [233] T. Zhang, H. Sun, A.C. Gerecke, K. Kannan, C.E. Müller, A.C. Alder, *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 5026.
- [234] R. Ma, K. Shih, *Environmental Pollution* 158 (2010) 1354.
- [235] B. Boulanger, A.M. Peck, J.L. Schnoor, K.C. Hornbuckle, *Environmental Science and Technology* 39 (2005) 74.
- [236] G.T. Tomy, S.A. Tittlemier, V.P. Palace, W.R. Budakowski, E. Braekevelt, L. Brinkworth, K. Friesen, *Environmental Science and Technology* 38 (2004) 758.
- [237] T.H. Begley, K. White, P. Honigfort, M.L. Twaroski, R. Neches, R.A. Walker, *Food Additives And Contaminants* 22 (2005) 1023.
- [238] E. Zafeiraki, D. Costopoulou, I. Vassiliadou, E. Bakeas, L. Leondiadis, *Chemosphere* 94 (2014) 169.
- [239] M.P. Martínez-Moral, M.T. Tena, *Talanta* 101 (2012) 104.
- [240] C. Moreta, M.T. Tena, *Journal of Chromatography A* 1355 (2014) 211.
- [241] A.D. Delinsky, M.J. Strynar, S.F. Nakayama, J.L. Varns, X. Ye, P.J. McCann, A.B. Lindstrom, *Environmental Research* 109 (2009) 975.
- [242] M. Llorca, M. Farré, Y. Picó, D. Barceló, *Journal of Chromatography A* 1216 (2009) 7195.
- [243] K. Kannan, K.J. Hansen, T.L. Wade, J.P. Giesy, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 42 (2002) 313.
- [244] Z. Kuklennyik, J.A. Reich, J.S. Tully, L.L. Needham, A.M. Calafat, *Environmental Science and Technology* 38 (2004) 3698.
- [245] K. Inoue, F. Okada, R. Ito, M. Kawaguchi, N. Okanouchi, H. Nakazawa, *Journal of Chromatography B* 810 (2004) 49.
- [246] A. Kärman, B. Van Bavel, U. Jämborg, L. Hardell, G. Lindström, *Analytical Chemistry* 77 (2005) 864.
- [247] K.J. Hansen, L.A. Clemen, M.E. Ellefson, H.O. Johnson, *Environmental Science and Technology* 35 (2001) 766.
- [248] I. Navarro, P. Sanz, M.Á. Martínez, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 400 (2011) 1277.

- [249] H. Yoo, J.W. Washington, T.M. Jenkins, J.J. Ellington, *Environmental Science and Technology* 45 (2011) 7985.
- [250] R. Guo, W. Sim, E. Lee, J. Lee, J. Oh, *Water Research* 44 (2010) 3476.
- [251] F. Li, C. Zhang, Y. Qu, J. Chen, L. Chen, Y. Liu, Q. Zhou, *Science of the Total Environment* 408 (2010) 617.
- [252] I. van der Veen, J. de Boer, *Chemosphere* 88 (2012) 1119.
- [253] Q. Zhang, M. Lu, X. Dong, C. Wang, C. Zhang, W. Liu, M. Zhao, *Environmental Science and Technology* 48 (2014) 6995.
- [254] P. Leonards, E.H. Steindal, I. van der Veen, V. Berg, J.O. Bustnes, S. van Leeuwen, *Chemosphere* (2011).
- [255] E. Martínez-Carballo, C. González-Barreiro, A. Sitka, S. Scharf, O. Gans, *Science of the Total Environment* 388 (2007) 290.
- [256] N. Green, M. Schlabach, T. Bakke, E.M. Brevik, C. Dye, D. Herzke, S. Huber, B. Plosz, M. Remberger, M. Schøyen, H.T. Uggerud, C. Vogelsang, *Screening of Selected Metals and New Organic Contaminants 2007*. NIVA Report 5569-2008, SPFO-Report 1014/2008. TA-2367/2008. ISBN:978-82-577-5304-7. 2008.
- [257] J. Björklund, S. Isetun, U. Nilsson, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 18 (2004) 3079.
- [258] J. Tollbäck, D. Tamburro, C. Crescenzi, H. Carlsson, *Journal of Chromatography A* 1129 (2006) 1.
- [259] T. Staaf, C. Östman, *Journal of Environmental Monitoring* 7 (2005) 344.
- [260] H. Carlsson, U. Nilsson, G. Becker, C. Östman, *Environmental Science and Technology* 31 (1997) 2931.
- [261] S. Isetun, U. Nilsson, A. Colmsjö, R. Johansson, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378 (2004) 1847.
- [262] A. Sjödin, H. Carlsson, K. Thuresson, S. Sjölin, Å. Bergman, C. Östman, *Environmental Science and Technology* 35 (2001) 448.
- [263] J.A. Andresen, A. Grundmann, K. Bester, *Science of the Total Environment* 332 (2004) 155.
- [264] I. Rodríguez, F. Calvo, J.B. Quintana, E. Rubí, R. Rodil, R. Cela, *Journal of Chromatography A* 1108 (2006) 158.
- [265] E. Fries, W. Püttmann, *Journal of Environmental Monitoring* 3 (2001) 621.
- [266] K. Bester, *Journal of Environmental Monitoring* 7 (2005) 509.
- [267] S.D. Kim, J. Cho, I.S. Kim, B.J. Vanderford, S.A. Snyder, *Water Research* 41 (2007) 1013.
- [268] K. Quednow, W. Püttmann, *Environmental Science and Pollution Research* 16 (2009) 630.
- [269] A. Bacaloni, C. Cavaliere, P. Foglia, M. Nazzari, R. Samperi, A. Laganà, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 21 (2007) 1123.
- [270] J. Regnery, W. Püttmann, *Water Research* 44 (2010) 4097.
- [271] S. Ishikawa, M. Taketomi, R. Shinohara, *Water Research* 19 (1985) 119.
- [272] M. García-López, I. Rodríguez, R. Cela, K.K. Kroening, J.A. Caruso, *Talanta* 79 (2009) 824.
- [273] S. Cao, X. Zeng, H. Song, H. Li, Z. Yu, G. Sheng, J. Fu, *Environmental Toxicology and Chemistry* 31 (2012) 1478.
- [274] J. Cristale, S. Lacorte, *Journal of Chromatography A* 1305 (2013) 267.

- [275] L. Campone, A.L. Piccinelli, C. Östman, L. Rastrelli, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397 (2010) 799.
- [276] A.M. Sundkvist, U. Olofsson, P. Haglund, *Journal of Environmental Monitoring* 12 (2010) 943.
- [277] X. Fan, C. Kubwabo, P.E. Rasmussen, F. Wu, *Science of the Total Environment* 491-492 (2014) 80.
- [278] S.H. Brandsma, U. Sellström, C.A. De Wit, J. De Boer, P.E.G. Leonards, *Environmental Science and Technology* 47 (2013) 14434.
- [279] T. Roth, R. Urpi Bertran, M. Pöhlein, M. Wolf, R. van Eldik, *Journal of Chromatography A* 1262 (2012) 188.
- [280] A. Ballesteros-Gómez, S.H. Brandsma, J. de Boer, P.E.G. Leonards, *Chemosphere* 116 (2014) 10.
- [281] X. Zeng, L. He, S. Cao, S. Ma, Z. Yu, H. Gui, G. Sheng, J. Fu, *Environmental Toxicology and Chemistry* 33 (2014) 1720.
- [282] R. Celano, I. Rodríguez, R. Cela, L. Rastrelli, A.L. Piccinelli, *Talanta* 118 (2014) 312.

