



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

**DETERMINACIÓN DE
CONTAMINANTES
ORGÁNICOS EN AGUAS
SUPERFICIALES
MEDIANTE LC-MS/MS Y
GC-MS/MS.**

Alumno: Jose Norberto Latorre Cruz.

Julio, 2019



UNIVERSIDAD DE JAÉN

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

Trabajo Fin de Grado

**DETERMINACIÓN DE
CONTAMINANTES
ORGÁNICOS EN AGUAS
SUPERFICIALES MEDIANTE
LC-MS/MS Y GC-MS/MS.**

Alumno: Jose Norberto Latorre Cruz.

Firma

Julio, 2019

INDICE

1. RESUMEN.	1
1.1. Abstract.	1
2. INTRODUCCIÓN.	2
2.1. Problemática del agua.	2
2.2. Contaminantes presentes en el agua.	5
<i>2.2.1. Contaminantes orgánicos prioritarios.</i>	<i>6</i>
<i>2.2.2. Contaminantes orgánicos emergentes.</i>	<i>8</i>
2.3. Legislación de la UE sobre contaminación química del agua.	10
2.4. Fundamentos de los métodos analíticos empleados para la determinación de contaminantes orgánicos.	19
<i>2.4.1. Tratamiento de la muestra.</i>	<i>19</i>
<i>2.4.2. Extracción líquido-líquido.</i>	<i>20</i>
<i>2.4.3. Extracción en fase sólida (SPE).</i>	<i>21</i>
<i>2.4.4. Análisis y detección de analitos.</i>	<i>23</i>
<i>2.4.5. Cromatografía de gases (GC).</i>	<i>23</i>
<i>2.4.6. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).</i>	<i>25</i>
<i>2.4.7. Espectrometría de masas (MS).</i>	<i>27</i>
3. OBJETIVOS.	31
4. PARTE EXPERIMENTAL.	31
4.1. Reactivos y materiales empleados.	31
4.2. Muestreo y conservación de muestra.	32
4.3. Determinación de contaminantes orgánicos mediante una extracción en fase sólida (SPE) y análisis por cromatografía de líquidos/espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS).	33
<i>4.3.1. Extracción en fase sólida.</i>	<i>33</i>
<i>4.3.2. Cromatografía de líquidos / espectrometría de masas en tándem (LC – MS/MS).</i>	<i>35</i>

4.4. Determinación de contaminantes orgánicos mediante extracción líquido-líquido (LLE) y análisis mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas en tandem (GC-MS/MS).	41
4.4.1. <i>Extracción líquido-líquido.</i>	41
4.4.2. <i>Cromatografía de gases / espectrometría de masas en tandem (GC – MS/MS).</i>	43
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	44
6. BIBLIOGRAFÍA.	46

1. RESUMEN.

En este trabajo de fin de grado se ha realizado un estudio de contaminantes orgánicos prioritarios y emergentes en 14 muestras de aguas superficiales de la provincia de Jaén, obtenidas en los pantanos de Rumblar, Giribaile, y en las lagunas de Garciez y Honda. Primero, las muestras fueron preconcentradas realizando dos tratamientos en función del tipo de compuestos estudiados: una extracción en fase sólida (SPE) utilizando un cartucho de tipo polimérico y mediante una extracción líquido-líquido (LLE) con hexano. A continuación, para que se produjera la separación e identificación de los analitos incluidos en el estudio se emplearon dos métodos: uno basado en cromatografía de líquidos de ultra elevada resolución/espectrometría de masas en tándem (UHPLC-MS/MS), que permitía el análisis de 100 pesticidas; y el segundo empleando cromatografía de gases/espectrometría de masas en tándem (GC-MS/MS), que permitía el análisis de 203 contaminantes orgánicos. Los resultados que fueron obtenidos mostraron la presencia de diversos pesticidas.

1.1. Abstract.

In this work, a study of priority and emerging organic pollutants has been conducted in 14 surface water samples obtained from the Rumblar, Giribaile, and Garciez and Honda lagoons, all of them located in the province of Jaén. First, samples were subjected to two different sample treatment procedures: solid phase extraction (SPE) using a polymer-type cartridge and a liquid-liquid extraction (LLE) with hexane (for GC-MS/MS analysis). Subsequently, the determination of the targeted species was carried out with two methods: ultra-high performance liquid chromatography/ tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) and gas chromatography /tandem mass spectrometry GC-MS/MS). Several pesticides and related organic contaminants were identified in each of the samples tested.

2. INTRODUCCIÓN.

2.1. Problemática del agua.

El agua es un recurso esencial para la vida de los seres vivos y el mantenimiento del medio ambiente. Es un recurso natural limitado, como consecuencia del desarrollo humano, económico y del uso inapropiado al que se le está sometiendo en estas últimas décadas, está sufriendo un grave deterioro, que afecta a su calidad y disponibilidad.

La contaminación del agua es un proceso que consiste en la alteración de la calidad de la misma, siendo peligrosa para el ser humano, agricultura, fauna e industria. Este proceso va a generarse cuando se modifique su composición como resultado de la actividad humana.

La calidad del agua es algo que durante varios años ha sido un gran motivo de preocupación, debido a la demanda de agua limpia y segura (Sousa et al., 2018), realizándose diferentes tipos de análisis para determinar cada uno de los contaminantes presentes en cada una de las muestras de agua, siendo necesario un método para poder detectar y cuantificar cada uno de ellos.

Cada año se descubren una gran cantidad de sustancias nuevas, siendo la mayoría de ellas contaminantes orgánicos, generándose, en consecuencia, toneladas de residuos peligrosos. Estas sustancias son introducidas en el medio sin tener en cuenta la repercusión que podrían tener sobre el mismo y en la salud de los seres vivos, denominándose a este tipo como contaminantes emergentes. Es importante que se realice un estudio tanto cualitativo como cuantitativo de los contaminantes que pueden encontrarse en el agua de consumo y en sus fuentes de contaminación (Robles Molina et al., 2014).

La incorporación de este tipo de contaminantes y sus metabolitos en el medio puede realizarse por vías diferentes: de forma directa mediante descargas de las aguas superficiales desde industrias o estaciones depuradoras de agua residual (EDARs) que han sido diseñados para cumplir en todo momento con la Directiva Europea, y de forma indirecta mediante filtraciones, utilización de abonos, etc. En la **Figura 1** se representan cada una de las rutas a través de las cuáles pueden entrar los contaminantes al medio (Robles-Molina et al., 2014).

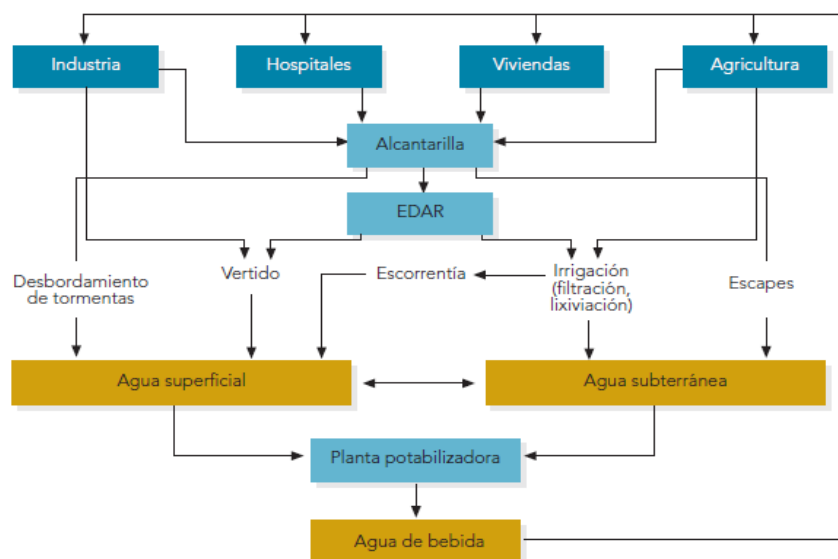


Figura 1. Esquema de las posibles rutas de incorporación de los contaminantes al medio (Robles-Molina et al., 2014).

La mejora de los procesos de tratamiento de los efluentes generados por las EDAR convencionales podría minimizar la descarga de contaminantes en las aguas receptoras, e incluso puede mejorar el estado general de la calidad de los efluentes para su posible reutilización (Barbosa et al., 2016).

Existen una serie de normativas para su control y los límites que deberían de tener cada uno de los contaminantes, los cuales deben de encontrarse a unas bajas concentraciones. Así, la UE establece una lista de 45 contaminantes prioritarios para ser monitorizados y mantenidos a unos determinados niveles, y siendo regulados por la Directiva 2013/39/EU (Comisión Europea, 2013), que se encuentra en constante modificación, debido a la elevada persistencia que se debe de tener con el ciclo del agua.

España es uno de los países con mayor escasez de agua en Europa, como puede verse en la **Figura 2**. A esto se deberá añadir que no llueve lo suficiente a causa del cambio climático (de origen antropogénico) y el aumento de la desertización que está sufriendo nuestro planeta, no pudiéndose abastecer las necesidades de toda España (Robles Molina, J. et al., 2014). Una posible solución para este problema es la reutilización del agua, ya que es una posibilidad a tener en cuenta además de que es respetuosa con el medio ambiente, no dependiendo sólo de la disponibilidad, sino también el tratamiento

que se lleva a cabo, por lo que es necesario conocer los contaminantes presentes (Rodríguez-Narvaez et al., 2017). España se encuentra situado como uno de los países que más la reutiliza dentro de Europa.



Figura 2. Distribución de la escasez del agua en las cuencas de los ríos más importantes del mundo (Robles-Molina et al., 2014).

Se han realizado algunos estudios en las cuencas del Ebro, Guadalquivir, Júcar y Llobregat, en los que se ha detectado la presencia de pesticidas, como la atrazina, simazina y fármacos como el acetaminofén, además de una gran cantidad de contaminantes industriales, como puede verse en el artículo de Kuzmanović et al., 2015, ya que estos no han sido eliminados en las EDARs, no siendo del todo eficientes.

La provincia de Jaén, es una región que presenta unas condiciones adecuadas para estudiar la contaminación que pueden causar los contaminantes prioritarios y emergentes, ya que posee humedales, pantanos, ríos y 4 parques naturales en toda su superficie de 13.496 km². Cabe destacar el río Guadalquivir, el cual atraviesa esta provincia de este a oeste, recogiendo a su paso potenciales contaminantes. La presencia de contaminantes en esta provincia se debe a la actividad industrial y principalmente a la agricultura, ya que Jaén es el principal productor de aceite de oliva en el mundo. La actividad agrícola es la fuente principal de riqueza, y en menor proporción son la industria de la madera, la metalurgia y la del ladrillo. Estas actividades pueden producir una contaminación de las aguas debido al alto uso de pesticidas en lo que se refiere al control de plagas del olivar por un lado y vertidos procedentes de las industrias mencionadas anteriormente por otro (Robles Molina et al., 2014). Asimismo, en

Jaén pueden localizarse diversas fuentes hidrológicas contaminadas, por lo que resulta propicio desarrollar nuevos métodos analíticos para la estimación de la contaminación de aguas en toda la provincia.

Una rigurosa evaluación de la contaminación ambiental requiere innovación constante en tecnologías, materiales cromatográficos y enfoques analíticos para obtener una identificación temprana y precisa cuantificación de cada sustancia capaz de comprometer la flora, la fauna y la integridad de la salud pública (Pérez-Fernández et al., 2017).

En las últimas décadas, extensos estudios han demostrado la presencia de contaminantes emergentes y sus metabolitos en aguas subterráneas, aguas residuales pluviales, agua potable, agua superficial, plantas y aguas residuales. Sin embargo, el patio de recreo común de los contaminantes emergentes son las aguas residuales industriales y domésticas en plantas de tratamiento (PTAR) que reciben las aguas residuales que vienen de las actividades humanas y de las descargas industriales (Dimpe & Nomngongo, 2016).

2.2. Contaminantes presentes en el agua.

Los contaminantes presentes en el agua pueden clasificarse dependiendo de su naturaleza. Uno de ellos puede ser los **agentes físicos**, como el calor, los **compuestos químicos** que pueden dividirse en **inorgánicos** los cuales pueden ser sales catiónicas como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ y aniónicas como CN^- , SO_4^- , Cl^- , HCO_3^- , F^- , Br^- , CO_3^{2-} , ácidos como el H_2SO_4 , HNO_3 , HCl y bases como el NaOH , KOH , elementos tóxicos que pueden ser metales como el Hg, Pb, Cd, Mn, Cr y no metales como As, Sb, B, elementos radioactivos, como el Ra^{226} , Cs^{137} , Sr^{90} , Th^{230} , gases como el NH_3 , O_2 , H_2S , CO_2 y especies minerales no disueltas, como la sílice y arcillas.

Por otro lado, los compuestos también pueden ser **orgánicos** los cuales van a tenerse en cuenta en este trabajo de fin de grado, como pueden ser proteínas, fármacos, aceites y grasas, hidrocarburos, jabones, detergentes, pesticidas, fenoles, PAHs...

Otro tipo son los **bionutrientes** que pueden ser compuestos nitrogenados, como el NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^- y fosforados, como el PO_4^{3-} . Y, por último, los **microorganismos**, como pueden ser las bacterias, virus, hongos, algas...

2.2.1. Contaminantes orgánicos prioritarios.

Los contaminantes prioritarios, están regulados por la **directiva 2013/39/EU** (Comisión Europea, 2013), la cual ha reemplazado a las directivas 2000/60/CE (Comisión Europea, 2000) y 2008/105/CE (Comisión Europea, 2008). Con ayuda de esta directiva, la UE puede gestionar aguas costeras, subterráneas, superficiales y continentales, para prevenir y reducir su contaminación, proteger el medio acuático, mejorar el estado de los ecosistemas y su uso sostenible. Son contaminantes que suponen un riesgo para el medio ambiente, acuático y para los seres vivos, por lo que deben de estar regulados en todo momento por una serie de legislaciones (Robles Molina et al., 2014). Casi todos estos compuestos ingresan al medio ambiente durante su consumo y producción, además que se encuentra a unas concentraciones de ppm o inferior (Pérez-Fernández et al., 2017).

Se encuentran 45 **contaminantes** clasificados como **prioritarios** regulados por la **Directiva 2013/39/EU** (Comisión Europea, 2013), debiendo de ser reducidos o eliminados. Algunos de ellos están clasificados como **peligrosos**, siendo estas sustancias tóxicas, bioacumulables y persistentes. A continuación, se explicarán los más importantes (Robles Molina et al., 2014).

Los **PAHs o hidrocarburos aromáticos policíclicos** están compuestos por 2 o más anillos de benceno fusionados. Son contaminantes que se generan durante la combustión incompleta o pirolisis del carbón, gasolina, petróleo, madera, gas, tabaco... a temperaturas superiores a 500 °C y con suficiente oxígeno para que se realice la combustión completa. Existen unos 100 tipos diferentes. Pueden introducirse en el medio ambiente a través de fuentes naturales como son las erupciones volcánicas, incendios forestales y por emisiones de actividades antropogénicas, como emisiones industriales o de tubos de escape de automóviles (Baek et al., 1991; Yang et al., 1998; Robles Molina et al., 2014). Además, estos contaminantes son solubles en agua pudiéndose encontrar en

muestras de agua superficial y residual a través de las descargas de las plantas industriales y las de tratamiento de aguas residuales (Ballesteros-Gómez et al., 2008; Robles-Molina et al., 2013), incluso se ha llegado a encontrar estos contaminantes en el aire y alimentos. Su toxicidad es baja, sin embargo, sus efectos cuando se someten a una exposición a largo plazo son preocupantes, debido a que puede derivar en una actividad cancerígena y mutagénica (Robles Molina et al., 2014).

Los **pesticidas o plaguicidas** son productos químicos empleados para eliminar y reducir plagas, como pueden ser animales, insectos, microorganismos, como virus o bacterias y hongos (Robles Molina et al., 2014). En función de su uso pueden clasificarse como, insecticidas o plaguicidas organoclorados donde cabría destacar el DDT (diclorodifeniltricloroetano) y el endosulfán, fungicidas, herbicidas, antibióticos que interviene en la inhibición de microorganismos patógenos y esterilizantes que inhiben la reproducción de los insectos, acaricidas, etc (Sánchez Ávila et al., 2012). Las concentraciones en las que deben encontrarse en algunos alimentos son muy bajas, en el orden de ppm, por lo que no van a suponer ningún problema, aunque tienen que estar controlados en todo momento. Una exposición prolongada puede provocar unos graves problemas de salud, como puede ser cáncer o problemas de fertilidad, siendo los más vulnerables a este tipo de efectos los niños (Robles Molina et al., 2014).

Los **PCBs o policlorobifenilos** son contaminantes aromáticos halogenados formados por 2 anillos bencénicos, estables a temperaturas elevadas (hasta 800 °C), resistentes a ácidos y bases, a la oxidación y, además, son poco solubles en agua. Son uno de los contaminantes más persistentes en el medio ambiente por su estabilidad y su lenta biodegradabilidad. Al ser solubles en grasas, tienen un elevado carácter bioacumulativo en la cadena alimentaria. No presentan toxicidad aguda, pero sí efectos crónicos a largo plazo (Bartolomé Jimeno et al., 2015).

Los **difeniléteres bromados o PBDEs**. Son compuestos orgánicos empleados en algunos productos industriales como retardantes de llama, teniendo una elevada eficacia y un bajo coste. Estos compuestos se ha demostrado que son tóxicos para el desarrollo neuronal (Robles Molina et al., 2014).

Los **detergentes o surfactantes** son compuestos orgánicos utilizados para la preparación de productos de limpieza, como puede ser el octiferol, nonilferol. Son compuestos tóxicos, persistentes y bioacumulables, siendo su principal efecto la alteración del equilibrio hormonal (Robles Molina et al., 2014).

Los **disolventes**, como pueden ser el diclorometano, tetracloroetileno, triclorometano, etc. Son sustancias peligrosas para los seres humanos debido a sus efectos cancerígenos. Los cloroalcanos de cadena corta son bioacumulativos y no se degradan con facilidad, pudiendo llegar a producir efectos perjudiciales en la fauna y la flora. Una exposición larga puede derivar en problemas en el riñón, glándula del tiroides e hígado (Robles Molina et al., 2014).

Hoy, estos compuestos son menos relevantes para los países industrializados, ya que se ha logrado una reducción drástica de las emisiones mediante la adopción de medidas apropiadas y la eliminación de las fuentes dominantes de contaminación (Gonzalez & Petrovic et al., 2003)

2.2.2. Contaminantes orgánicos emergentes.

Aquellos contaminantes que no están regulados por ninguna normativa y su presencia en el entorno no es ninguna novedad, pero si la inquietud que ha despertado hace relativamente poco debido a sus posibles consecuencias a corto y largo plazo. Todavía no se conocen los problemas que pueden llegar a desencadenar este tipo de contaminantes en el medio ambiente y en la salud de los seres vivos, no obstante, se encuentran cada vez más debido a su elevada producción y consumo, siendo la gran mayoría de origen antropogénico (Gogoi et al., 2018). Debiendo de ser regulados sus niveles de concentración, su grado de toxicidad, bioacumulabilidad y persistencia, aunque no necesitan este último para ocasionar efectos negativos. El gran problema de estos contaminantes es que su concentración varía dependiendo de la zona en la que se encuentren, como en aguas superficiales, aguas potables, aguas subterráneas, aguas residuales y en EDAR, ya que su actual diseño no elimina los contaminantes emergentes y sus metabolitos, liberándose en ríos, arroyos, efluentes, etc, habiendo una gran ausencia sobre la forma de eliminarlos. Generalmente, se

encuentran en unas concentraciones de entre ng/L y µg/L (Gogoi et al., 2018) (Robles Molina et al., 2014) (Barbosa et al., 2016) (Gonzalez & Petrovic et al., 2003).

De esta manera el estudio de este tipo de contaminantes se realiza de forma preferencial en la Agencia para la protección del Medio Ambiente (EPA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), ya que estas entidades se ocupan fundamentalmente de la protección del medio ambiente y de la salud pública.

Debido a la ausencia de datos relevantes sobre los impactos, el destino y los niveles de concentración de los contaminantes emergentes, hacen que sea problemático para los gobiernos controlar su utilización y también gestionar los niveles que ya están persistiendo en el medio ambiente, por lo que actualmente tampoco son monitoreados ni regulados en el agua potable. De momento no hay leyes o mandatos que ilustran los límites superiores de las concentraciones de contaminantes emergentes en la descarga de aguas residuales, agua potable o el medio ambiente (Gogoi et al., 2018).

Los principales contaminantes emergentes aparecen en la **tabla 1**, siendo algunos de origen natural (toxinas, hormonas, etc.) y de origen sintético o antropogénico (nanomateriales, compuestos perfluorados, filtros UV, plastificantes, retardantes de llama, drogas ilícitas, productos de cuidado personal, cosméticos o de limpieza, productos farmacéuticos, compuestos de alteración endocrina (ECD) etc.), siendo los 3 últimos los que se están estudiando con mayor profundidad, incluyendo también a sus metabolitos (Pérez-Fernández et al., 2017) (Pico et al., 2019) (Gogoi et al., 2018) (Dimpe & Nomngongo, 2016). La consecuencia por las que se ha experimentado un gran aumento en la cantidad de fármacos no está del todo clara, pero el riesgo que conlleva es evidente y alarmante.

Tabla 1. Productos investigados como contaminantes emergentes (Robles Molina et al., 2014) (Petrovic et al., 2010).

Contaminante emergentes	
- Aditivos para la gasolina, como éteres de alquilos o el éter metil-t-butilo.	- Organofosforados ignífugos y plastificantes.
- Agentes de limpieza superficial, como alquifenoles y carboxilatos alquifenoles.	- Nanomateriales (nanopartículas)
- Agentes para protección de la luz solar, como benzofenona, metil-benzilideno.	- Plaguicidas polares y sus productos de degradación/transformación.
- Agentes y aditivos industriales, como el 2-cloroetilfosfato.	- Productos analgésicos o antiinflamatorios, como ibuprofeno, paracetamol, ácido acetil-salicílico.
- Antisépticos, como triclosan o clorofeno.	- Productos farmacéuticos, como antibióticos humanos o de consumo veterinario como el trimetoprim.
- Betabloqueantes, como metropolol, propranolol o timolol.	- Productos para la higiene y cuidado personal, como fragancias, geles o jabones.
- Compuestos perfluorados.	- Reguladores lípidos, como el bezafibrato.
-Contrastes para rayos X, como lopromida y opamidol diatrizoato.	- Repelentes de insectos, como el NN-dietil-toluamida (DEET).
Drogas (de abuso y sus metabolitos) psiquiátricas, como diazepam.	-Retardantes de llama, como los éteres polibromados, que se añaden a los plásticos especialmente a los muebles, productos electrónicos, TV, y que se encuentran en la sangre humana, leche, grasa, placenta, produciendo efectos nocivos en una disrupción endocrina.
Esteroides u hormonas, como el estradiol, estrona, estriol, DES y otros compuestos disruptores endocrinos.	- Subproductos de la desinfección, como bromoácidos, bromoacetnitrilos, bromatos, etc.
- Organometálicos.	- Toxinas algales y cianobacterias.

2.3. Legislación de la UE sobre contaminación química del agua.

La Unión Europea ha realizado expansiones y actualizaciones de su política de aguas y normativas desde los años 70 hasta la actualidad. Al principio, la legislación estuvo orientada hacia mínimos niveles de calidad, pero en los últimos años, el gran aumento de la contaminación de las aguas ha provocado

su variación. Para esto, la comunidad europea ha establecido unas normativas, en las que cada una de ellas hacen referencia a una serie de parámetros de calidad.

La incorporación de España a la Unión Europea fue en 1986, estando en ese momento en vigor la **Ley de Aguas 29/1985** (Comisión Europea, 1985), vigente hasta 2001. Se trataba de una medida legislativa para proteger los recursos hídricos y para armonizar e igualar la legislación española y europea. Era una normativa de materias de aguas y presenta diferentes niveles de competencia, teniendo a nivel europeo, directivas y reglamentos, a nivel nacional, reales decretos y órdenes y a nivel autonómico, leyes y decretos legislativos, al igual que su marco de aplicación (aguas superficiales, aguas subterráneas, aguas de consumo, etc) y aspectos a tener en cuenta.

La calidad del agua es un tema importante en la Unión Europea. Particularmente, existe una creciente preocupación relacionada con la presencia de sustancias emergentes y prioritarias en aguas superficiales. Por este motivo, la Unión Europea estableció la directiva **2000/60/EC o directiva del Marco de Agua (DMA)** (Comisión Europea, 2000) (Robles-Molina, Gilbert-López, et al., 2014). Establecen un marco comunitario de actuación de la política de agua para la protección de las aguas superficiales continentales, costeras y subterráneas para prevenir o reducir su contaminación, promover un consumo y uso sostenible, proteger el medio ambiente, mejorar el estado de los ecosistemas acuáticos... La comisión se ve obligada a identificar sustancias y clasificarlas en prioritarias o peligrosas, para que se lleve a cabo un control (Robles-Molina et al., 2014).

La directiva establece en 2001 (**Decisión N°. 2455/2001/EC**) (Comisión Europea, 2001) una primera lista, la cual es revisada cada cuatro años, de sustancias prioritarias compuestas por 33, algunas de ellas marcadas como sustancias peligrosas. Las **33 sustancias prioritarias** se muestran en **tabla 2** (Sousa et al., 2018).

Tabla 2. Contaminantes prioritarios en la política de aguas (Decisión nº 2455/2001/CE).

Nombre del contaminante prioritario	Peligroso	Nombre del contaminante prioritario	Peligroso
1. Alacloro.		18. Lindano (Hexaclorociclohexano).	X
2. Antraceno (PAHs).	X	19. Isoproturón.	
3. Atrazina.		20. Plomo y sus compuestos.	
4. Benceno.		21. Mercurio y sus compuestos.	X
5. Difeniléteres bromados.	X	22. Naftaleno.	
6. Cadmio y sus compuestos.	X	23. Níquel y sus compuestos.	
7. C ₁₀₋₁₃ -cloroalcanos.	X	24. Nonilfenoles (4-(para)-nonilfenol).	X
8. Clorofenvinfos.		25. Octilfenoles (para-ter-octilfenol).	
9. Cloropirifos.		26. Pentaclorobenceno.	X
10. 1,2-dicloroetano.		27. Pentaclorofenol.	
11. Diclorometano.		28. PAHs (Benzo(a)pireno), Benzo (b) fluoranteno, Benzo (g,h,i) perileno, Benzo (k) fluoroanteno) (Indeno (1,2,3-cd)pireno).	X
12. Di (2-etilhexil) ftalato (DEHP).	X	29. Simazina.	
13. Diurón.		30. Compuestos del Tributilestaño.	X
14. Endosulfán (α -endosulfán).	X	31. Triclorobencenos (1,2,4-triclorobenceno).	X
15. Fluoranteno (PAHs).		32. Triclorometano (cloroformo).	
16. Hexaclorobenceno.	X	33. Trifluralina.	X
17. Hexaclorobutadieno.	X		

El marco legal estableció el **Real Decreto RD/40/2003** (Comisión Europea, 2003) en el que se intenta responder a las exigencias actuales de las sociedades

europeas, con una elevada percepción de la calidad de los servicios y creciente demanda de información. Este Real Decreto extiende su ámbito a aguas de consumo y a todas aquellas aguas de uso doméstico, sea cual sea su origen y su modo de suministro, así como a aguas usadas en la industria alimentaria.

La calidad del agua viene determinada por su composición y se establece en función del uso al que vaya a ser destinado. Así, las aguas destinadas al abastecimiento de la población deben cumplir las exigencias de calidad del Real Decreto 140/2003 (Comisión Europea, 2003) por el que se aprueba la reglamentación Técnico – Sanitaria para el abastecimiento control de calidad de aguas potables de consumo público.

En 2007, en España se estableció el real decreto **1620/2007 o reglamento “REACH”** (Comisión Europea, 2007) (registro, evaluación, autorización y restricción de sustancias químicas), es una legislación europea que no está directamente relacionada con las aguas costeras ni con el medio ambiente. Este Real Decreto es una herramienta que supondría un control estricto y un conocimiento detallado de los riesgos de las sustancias químicas tanto para el medio ambiente como para la salud del ser humano. Además de reducir el descontrol que ha habido durante años en la creación, producción y comercialización de sustancias químicas de las cuales, se desconoce totalmente los efectos que pueden tener en el medio ambiente.

En 2008, se publicó la **Directiva 2008/105/CE** (Comisión Europea, 2008) que modificó la directiva 2000/60/CE (Comisión Europea, 2000) (Sousa et al., 2018) la cual incluye los **límites de concentraciones** y los **estándares** (EQS) de los 33 contaminantes prioritarios en aguas, estableciéndose para controlarlos. Los estándares de calidad ambiental de la UE, además de ser monitoreados (Robles-Molina et al., 2013), fijan la concentración máxima permitida y el valor promedio anual en agua y la concentración promedio anual en biota para algunos de estos compuestos. Esta norma exige un inventario de vertidos, emisiones y pérdidas de sustancias (Pico et al., 2019) (Robles-Molina et al., 2014).

Actualmente, la **Directiva 2013/39/CE** (Comisión Europea, 2013) es la que regula las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas, ampliando la lista de **contaminantes prioritarios de 33 a 45**, de las cuales **21 son**

identificadas como peligrosos, incluyendo 41 contaminantes orgánicos persistentes y metales como el cadmio, mercurio, níquel y plomo (Sousa et al., 2018). Encontrándose los 12 nuevos contaminantes recogidos en la **tabla 3**, además habría que destacar que estos eran considerados hasta hace muy poco como emergentes.

Tabla 3. Listado de contaminantes prioritarios incluidos en la Decisión nº2455/2001/CE (Comisión Europea, 2001) en la política de aguas (Directiva modificativa 2013/39/CE).

Nombre del contaminante prioritario	Peligroso	Nombre del contaminante prioritario	Peligroso
1. Dicofol.	X	7. Cibutrina.	
2. Ácido perfluoro-octano-sulfónico y sus derivados (PFOS).	X	8. Cipermetrina.	
3. Quinoxifeno.	X	9. Diclorvós.	
4. Dioxinas y compuestos similares.	X	10. Hexabromo-ciclododecanos (HBCDD).	X
5. Aclonifeno.		11. Heptacloro y epóxido de heptacloro.	X
6. Bifenox.		12. Terbutrina.	

La naturaleza peligrosa de los contaminantes prioritarios es causada por su toxicidad en combinación con una alta estabilidad química y biológica, y una alta lipofilidad (afinidad por los lípidos). Se acumulan en los tejidos adiposos de peces, fauna, flora y seres humanos a través de rutas dietéticas y no dietéticas (Robles-Molina et al., 2014).

En **tabla 4**, aparecen las concentraciones máximas admisibles de la norma de calidad ambiental que se admiten para los 45 contaminantes prioritarios en aguas superficiales, continentales y otras, esta lista podría ser modificada o ampliada en un futuro.

Tabla 4. Normas de calidad ambiental (NCA) para los contaminantes prioritarios **Directiva 2013/39/CE** (Comisión Europea, 2013) y otros contaminantes en µg/L (Robles-Molina et al., 2014).

Nombre del contaminante	MA-NCA aguas superficiales continentales	MA-NCA otras aguas superficiales	CMA-NCA aguas superficiales continentales	CMA-NCA otras aguas superficiales
1. Alacloro.	0,3	0,3	0,7	0,7
2. Antraceno (PAHs).	0,1	0,1	0,1	0,1
3. Atrazina.	0,6	0,6	2,0	2,0
4. Benceno.	10	8	50	50
5. Difeniléteres bromados.			0,14	0,014
6. Cadmio y sus compuestos.	≤0.08 (Clase1) 0.08 (Clase2) 0.09 (Clase3) 0.15 (Clase4) 0.25 (Clase5)	0,2	≤0.45 (Clase1) 0.45 (Clase2) 0.6 (Clase3) 0.9 (Clase4) 0.15 (Clase5)	≤0.45 (Clase1) 0.45 (Clase2) 0.6 (Clase3) 0.9 (Clase4) 0.15 (Clase5)
6a. Tetracloruro de carbono.	12	12	No aplicable	No aplicable
7. C ₁₀₋₁₃ -cloroalcanos.	0,4	0,4	1,4	1,4
8. Clorofenvinfos.	0,1	0,1	0,3	0,3
9. Cloropirifos.	0,03	0,03	0,1	0,1
9a. Plaguicidas ciclodieno (Aldrin, Dieldrin, Endrin, Isodrin)	Σ = 0.01	Σ = 0.005	No aplicable	No aplicable
9b. DDT total	0,025	0,025	No aplicable	No aplicable
Para-para-DDT.	0,01	0,01	No aplicable	No aplicable
10. 1,2-dicloroetano.	10	10	No aplicable	No aplicable
11. Diclorometano.	20	20	No aplicable	No aplicable
12. Di (2-etilhexil) ftalato (DEHP).	1,3	1,3	No aplicable	No aplicable
13. Diurón.	0,2	0,2	1,8	1,8

14. Endosulfán (α-endosulfán).	0,005	0,0005	0,01	0,004
15. Fluoranteno (PAHs).	0,0063	0,0063	0,12	0,12
16. Hexaclorobenceno.			0,05	0,05
17. Hexaclorobutadieno.			0,6	0,6
18. Lindano (Hexaclorociclohexano).	0,02	0,002	0,04	0,02
19. Isoproturón.	0,3	0,3	1,0	1,0
20. Plomo y sus compuestos.	1,2	1,3	14	14
21. Mercurio y sus compuestos.			0,07	0,07
22. Naftaleno.	2	2	130	130
23. Níquel y sus compuestos.	4	8,6	34	34
24. Nonilfenoles (4-(para)-nonilfenol).	0,3	0,3	2,0	2,0
25. Octilfenoles (para-ter-octilfenol).	0,1	0,01	No aplicable	No aplicable
26. Pentaclorobeneno.	0,007	0,0007	No aplicable	No aplicable
27. Pentaclorofenol.	0,4	0,4	1	1
28. PAHs	No aplicable	No aplicable	No aplicable	No aplicable
Benzo(a)pireno	$1,7 \times 10^{-4}$	$1,7 \times 10^{-4}$	0,27	0,027
Benzo (b) fluoranteno			0,017	0,017
Benzo (g,h,i) perileno			0,017	0,017

Benzo (k) fluoroanteno			$8,2 \times 10^{-3}$	$8,2 \times 10^{-4}$
Indeno (1,2,3-cd)pireno.			No aplicable	No aplicable
29. Simazina.	1	1	4	4
29a. Tetracloroetile no.	10	10	No aplicable	No aplicable
29b. Tricloroetileno.	10	10	No aplicable	No aplicable
30. Compuestos del Tributilestaño.	0,0002	0,0002	0,0015	0,0015
31. Triclorobencenos (1,2,4-triclorobenceno).	0,4	0,4	No aplicable	No aplicable
32. Triclorometano (cloroformo).	2,5	2,5	No aplicable	No aplicable
33. Trifluralina.	0,03	0,03	No aplicable	No aplicable
34. Dicofol.	$1,3 \times 10^{-3}$	$3,2 \times 10^{-5}$	No aplicable	No aplicable
35. Ácido perfluoro-octano-sulfónico y sus derivados (PFOS).	$6,5 \times 10^{-4}$	$1,3 \times 10^{-4}$	36	7,2
36. Quinoxifeno.	0,15	0,015	2,7	0,54
37. Dioxinas y derivados			No aplicable	No aplicable
38. Aclonifeno.	0,12	0,12	0,12	0,12
39. Bifenox.	0,012	0,0012	0,04	0,004
40. Cibutrina.	0,0025	0,0025	0,016	0,016
41. Cipermetrina.	8×10^{-5}	8×10^{-6}	6×10^{-4}	6×10^{-5}
42. Diclorvós.	6×10^{-4}	6×10^{-5}	7×10^{-4}	7×10^{-5}
43. Hexa-bromo-ciclodecano (HBCDD).	0,0016	0,0008	0,5	0,05

44. Heptacloro epóxido y Heptacloro.	2×10^{-7}	1×10^{-8}	3×10^{-4}	3×10^{-5}
45. Terbutrina.	0,065	0,0065	0,34	0.034

Además, esta Directiva propuso una primera lista de seguimiento de sustancias para el monitoreo a nivel de la Unión Europea en el campo de la política del agua, que luego se publicó en la **Decisión 2015/495/UE** (Comisión Europea, 2015). La lista de vigilancia contiene 17 compuestos orgánicos (Barbosa et al., 2016) y se muestran en la **tabla 5**. Esta decisión también incluye la indicación de las matrices a monitorear y los posibles métodos de análisis para cada sustancia (Sousa et al., 2018).

Tabla 5. Lista de seguimiento contaminantes decisión 2015/495/CE (Comisión Europea, 2015) (Barbosa et al., 2016).

Contaminantes Orgánicos	
- 3 estrógenos, uno de ellos sintético como el 17-beta-etinilestradiol (EE2) y 2 naturales, como la estrona (E1) y el 17-beta-estradiol (E2).	- 3 antibióticos macrólidos, como son la azitromicina, claritromicina y eritromicina.
- Diclorofenaco.	- Metiocarb.
- 2,6-di-terc-butil-4-metilfenol.	- 5 neonicotinoides, como el Imidacloprid, Tiacloprid, Tiametoxam, Clotianidina, Acetamiprid.
- 2-etilhexil-4-metoxicinamato.	- 2 herbicidas, como oxadiazón y triallato.

En este trabajo de fin de grado va a determinarse una gran cantidad de contaminantes prioritarios y emergentes en aguas superficiales, realizándose una etapa de preconcentración de la muestra, ya que este tipo de contaminantes se encuentran a unas bajas concentraciones (ng/L y µg/L), mediante una extracción en fase sólida (SPE) que a su vez actúa como una etapa de purificación, eliminándose un gran número de interferentes, o también puede realizarse una extracción líquido – líquido con disolventes orgánicos inmiscibles. La etapa de detección puede ser complementaria al análisis utilizando una cromatografía de líquidos acoplada con un espectrómetro de masas en tándem LC – MS/MS o cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas en tándem GC – MS/MS (Robles-Molina et al., 2014).

2.4. Fundamentos de los métodos analíticos empleados para la determinación de contaminantes orgánicos.

2.4.1. Tratamiento de la muestra.

El tratamiento de muestra puede considerarse como un punto crítico dentro del proceso analítico, ya que su influencia sobre el resultado es incluso más importante que la medida en sí misma o la precisión del instrumento. Esta etapa consiste en una serie de pasos encaminados a la obtención de un extracto que contenga los analitos de interés en un disolvente adecuado para la técnica de detección a emplear (Robles Molina et al., 2014).

Este tratamiento permite aislar y preconcentrar los contaminantes de la matriz y eliminar sus interferentes.

Normalmente, la falta de automatización hace que el tratamiento de muestra consuma la mayor cantidad de tiempo de todo el proceso analítico (Petrovic et al., 2010). El método de extracción seleccionado dependerá principalmente de la naturaleza de los compuestos a analizar, de la matriz analizada (aguas, sedimentos, suelos, alimentos...) así como de sus propiedades físico-químicas, como son la volatilidad, polaridad, estabilidad y solubilidad, de las técnicas cromatográficas (LC o GC) y del sistema de detección empleado. Además del equipamiento disponible, los requisitos en cuanto a sensibilidad, selectividad y rapidez serán también determinantes a la hora de seleccionar las etapas de tratamiento (Robles Molina et al., 2014).

Hay dos procedimientos que se suelen emplear en función de la naturaleza de los analitos que se quieran medir. Para compuestos poco solubles en agua y por tanto apolares y moderadamente volátiles, se suele usar una extracción líquido-líquido y para el análisis una cromatografía de gases, determinándose los contaminantes prioritarios. Mientras que, para compuestos más solubles en agua y que no sean volátiles, se suele emplear una extracción en fase sólida, ya que se cubre en una única extracción una amplia variedad de compuestos orgánicos, seguido de una cromatografía líquida, en este caso se utilizarán para determinar contaminantes emergentes (Robles-Molina et al., 2013).

Actualmente, la preparación de la muestra se está moviendo hacia el respeto al medio ambiente, bajo coste, miniaturización, automatización y la sencillez (Dimpe & Nomngongo, 2016).

2.4.2. Extracción líquido-líquido.

Es una técnica de extracción basada en el reparto de un soluto (analito) entre dos fases líquidas inmiscibles, la fase acuosa y la fase orgánica. El analito se encontrará en una fase o en otra dependiendo de la apetencia que tenga por un disolvente u otro, siendo los más utilizados para la separación de analitos apolares el hexano, ciclohexano, diclorometano, cloroformo, etc. Este proceso se realiza en un embudo de decantación (Robles Molina et al., 2014).

Para mejorar la separación se puede agitar el embudo para que se pongan en contacto ambas fases, dejando el embudo en reposo para que ambas se separen. En este caso se producirá un equilibrio entre las 2 fases gobernado por una constante de equilibrio, esta debe de ser lo más elevada posible, permitiendo así una extracción efectiva de los analitos. Finalmente se recoge la fase orgánica y se desecha la acuosa (Robles Molina et al., 2014).

En la **Figura 3** se explica cada una de las etapas que se realizan en la extracción líquido – líquido.

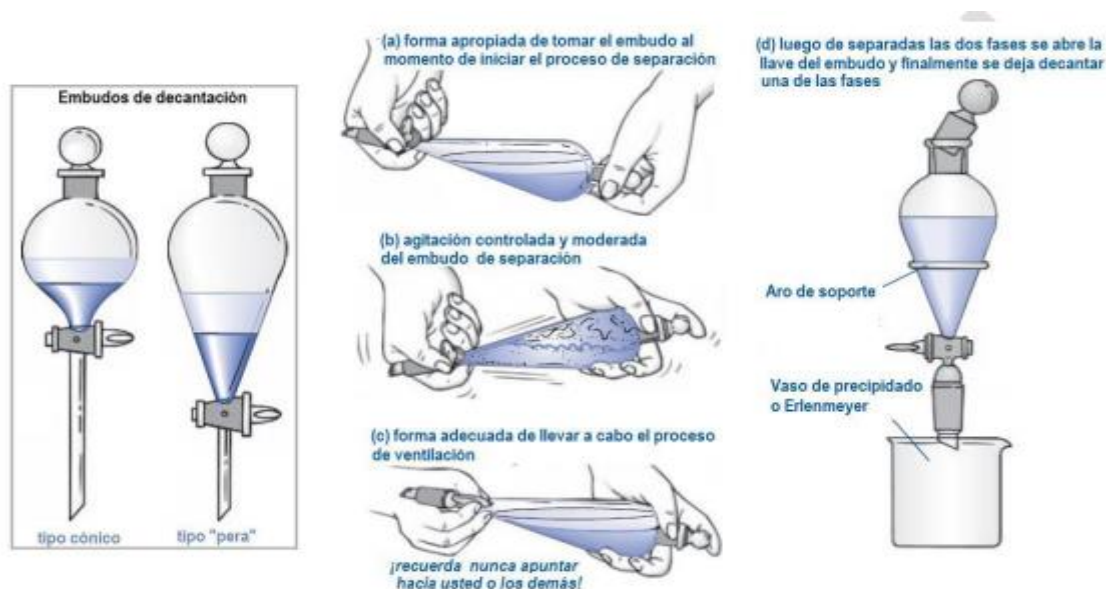


Figura 3. Materiales y técnica para extracciones líquido-líquido (Gilbert & Martin, 2011).

Generalmente para incrementar la eficacia de la extracción de los analitos de interés suele repetirse este proceso en varias ocasiones (Robles Molina et al., 2014).

Las principales ventajas de esta técnica es que tiene una elevada recuperación, sencillez, rapidez y un bajo coste, pero es un proceso con falta de automatización, consume una gran cantidad de disolventes y se forman emulsiones con gran facilidad (Pérez-Fernández et al., 2017).

2.4.3. Extracción en fase sólida (SPE).

La extracción en fase sólida o SPE es una técnica de preparación muy usada para el aislamiento y purificación de analitos polares a partir de una fase líquida (Robles Molina et al., 2014).

Se dispone de una muestra líquida que se pone en contacto con una columna (cartucho) que tiene un sorbente sólido, distribuyéndose cada analito en función de su mayor o menor afinidad, quedando algunos retenidos en la columna, eluyéndose con un disolvente adecuado. También puede realizarse una etapa de limpieza en la que se pasa la muestra por el cartucho y se utiliza un disolvente que no eluya los analitos y sí los interferentes de la muestra, utilizándose para la preconcentración de la muestra con un riesgo mínimo de pérdida o contaminación de la misma (Robles Molina et al., 2014).

Las etapas que deben de realizarse son: 1) **Acondicionamiento del cartucho**, en este caso lo que se pretende es activar la capacidad del adsorbente para retener a los analitos, siempre bajo presión, por lo que primero se realizará la activación del sorbente con un disolvente y luego el acondicionamiento con otro, 2) se **introduce la muestra** en el cartucho, también bajo presión, 3) **Lavado** (opcional) y 4) **Elución**, mediante el empleo de un disolvente adecuado capaz de eluir los analitos que han quedado retenidos en el cartucho. En la **Figura 4** se explica el proceso que se llevaría a cabo (Robles Molina et al., 2014).

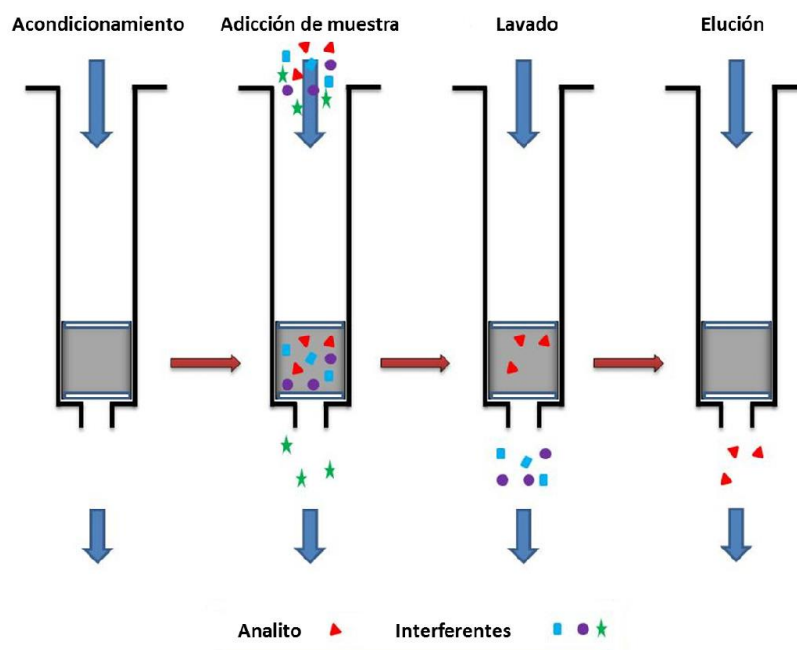


Figura 4. Etapas de la extracción en fase sólida empleada en este trabajo (Herrera-Sonia et al., 2015).

Los factores que pueden ser determinantes en esta técnica son la capacidad de activación del sorbente sólido (acondicionamiento) y la retención de analitos en el mismo, por lo que debe de tenerse en cuenta el caudal con el que se pasará la muestra por el cartucho, la cantidad de muestra que se introduce, etc. Los cartuchos más utilizados son Oasis HLB© (hidrófilo-lipófilo equilibrado) (fase reversa), debido a unas mejores recuperaciones y extracciones de contaminantes emergentes (Dimpe & Nomngongo, 2016) (Robles Molina et al., 2014), pero estos no son muy selectivos, ya que retienen a un amplio rango de analitos independientemente de su polaridad, recomendándose un pH neutro para recuperar todos los compuestos (Petrovic et al., 2010).

En comparación, con la extracción líquido – líquido, es mucho más selectiva, automatizada, ausencia de emulsiones, con una menor utilización de disolventes orgánicos, simplicidad, reproducibilidad, aplicabilidad y se considera buena práctica para preconcentrar muestras de agua antes de la cuantificación final para disminuir los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) del método (Rodríguez-Narvaez et al., 2017) (Dimpe & Nomngongo, 2016).

2.4.4. Análisis y detección de analitos.

El análisis de contaminantes orgánicos y sus metabolitos en muestras acuosas debe de realizarse con técnicas específicas para su detección y ser lo suficientemente sensibles para identificar contaminantes que tengan concentraciones bajas (Robles Molina et al., 2014).

El análisis de este tipo de contaminantes puede ser una tarea difícil ya que muchos son muy polares, tienen bajos pesos moleculares y son sensibles a los aumentos de temperatura (Robles Molina et al., 2014).

Para determinar correctamente la concentración de cada uno de los contaminantes, se necesitan utilizar técnicas analíticas, como la cromatografía de gases (GC), para analizar sustancias como los productos de higiene y PAHs, debido a su baja polaridad y volatilidad o de líquidos (LC), para analizar fármacos ya que presentan una elevada polaridad y baja volatilidad, estas dos técnicas se encontrarán acopladas con la espectrofotometría de masas (MS). En la actualidad, uno de los métodos más utilizados son los multi-analito, debido a la capacidad de analizar diferentes analitos en un mismo método, ya que permite conocer de una forma amplia y fiable, la presencia de los diferentes contaminantes orgánicos en el medio ambiente (Robles Molina et al., 2014).

2.4.5. Cromatografía de gases (GC).

En esta técnica cromatografica, la muestra se volatiliza en el momento que entra en el sistema de inyección, para que esto suceda debe de haber un horno que someta la muestra a una elevada temperatura. Una vez que la muestra se encuentra en estado gaseoso, pasa a la columna, y a continuación es arrastrada por una fase móvil que normalmente es un gas inerte (He o N), el cual no interactúa en ningún momento con el analito, su única función es transportarlo por la columna. Esta consta de una fase estacionaria (o fase líquida) cuyo objetivo es retener a los analitos dependiendo de la afinidad que tengan con ella. Por lo que su tiempo de retención va a depender principalmente de la interacción que tengan los analitos con la fase estacionaria, pudiéndose analizar cada analito de forma separada. Seguidamente alcanzarán el detector y se obtendrán los resultados pertinentes al análisis (Robles Molina et al., 2014).

La cromatografía de gases se usa para el análisis de compuestos que presentan una elevada volatilidad a temperaturas por debajo de los 350 – 400 °C, además deben ser termoestables y no degradarse en ningún momento en reacciones secundarias. También se debe de tener en cuenta que la naturaleza de estos compuestos es apolar, por lo que se analizarán una gran cantidad de contaminantes prioritarios (Robles Molina et al., 2014).

Los distintos componentes que forman del cromatógrafo de gases, pueden verse en la **Figura 5**.

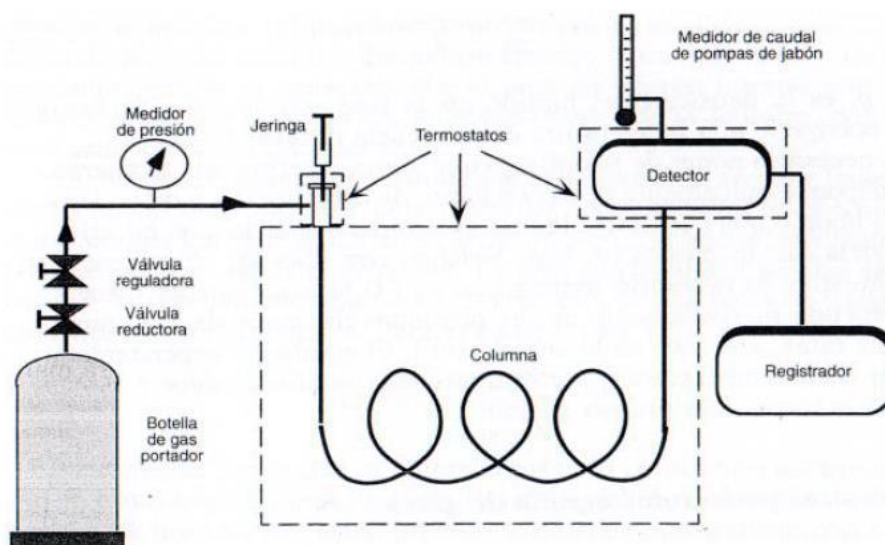


Figura 5. Esquema de los componentes de un cromatógrafo de gases (Hernández Hernández, González Pérez, 2002).

Uno de los constituyentes más importantes es la columna ya que en ella se produce la identificación, separación y determinación de los componentes de la muestra. Existen 2 tipos de columnas, las empaquetadas y las capilares que son las que más se usan actualmente (Robles Molina et al., 2014).

Existen 2 métodos de trabajo, el isocrático, en el que la temperatura tiene que ser constante debido a que los analitos tienen un punto de fusión similar, para que así la separación sea óptima. Y el de gradiente de temperatura, en el que los analitos tienen diferente punto de ebullición, por lo que se producirá un aumento progresivo de la temperatura, provocando una elución gradual de los analitos, este último es el más utilizado debido a que disminuye los tiempos de análisis y mejora considerablemente la resolución.

Anteriormente, se utilizaba el detector de ionización de llama (FID), detectores selectivos como el detector de conductividad térmica (TCD) o el de captura de electrones (ECD). En la actualidad el acoplamiento con el MS, le confiere una gran cantidad de ventajas frente a los detectores convencionales que se utilizaban para compuestos apolares y volátiles (Robles Molina et al., 2014).

2.4.6. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

Es una técnica cromatográfica en la que la fase móvil suele ser un líquido, al igual que la fase estacionaria, generalmente de naturaleza apolar y que se encuentra estática sobre la superficie de un sólido inerte. Normalmente, se usa una elución en gradiente de elevada presión, trabajándose con una mezcla de 2 o 3 disolventes de diferente polaridad, variando su proporción durante el análisis (Robles Molina et al., 2014).

Los distintos componentes que forman del cromatógrafo de gases, pueden verse en la **Figura 6**.

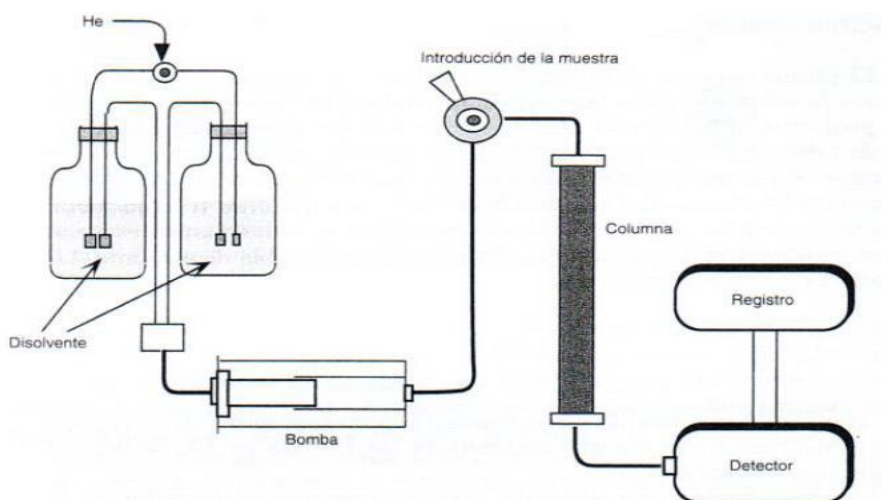


Figura 6. Esquema de los componentes de un cromatógrafo de líquidos (Hernández Hernández, González Pérez, 2002).

A través de la columna la muestra se somete a una elevada presión debido al gran tamaño de las partículas presentes en la fase estacionaria, ya dependiendo de su naturaleza va a producirse un tipo de separación u otra, en fase normal (fase estacionaria polar) o reversa (fase estacionaria apolar), siendo esta última la más utilizada debido al uso como fase móvil del agua y metanol.

La separación que se lleva a cabo en la cromatografía de líquidos es mediante la diferente afinidad que pueden presentar los analitos por la fase estacionaria o fase móvil, cuanto mayor sea su afinidad por la fase estacionaria más retenidos estarán estos compuestos en la columna, por lo que tardarán más en salir, teniendo unos tiempos de retención más elevados y llevará más tiempo detectarlos. En cambio, habrá analitos que tengan menos afinidad por la fase estacionaria, por lo que estos serán los primeros en salir y aparecer en el detector.

De manera similar a la cromatografía de gases en la que tenía 2 modos de trabajos, en la cromatografía de líquidos la separación puede realizarse de 2 formas, en gradiente de elución, en este caso la composición de la fase móvil varía con respecto al tiempo, con la finalidad de modificar su poder eluyente, y con una composición de la fase móvil constante o modo isocrático. En el primer caso se obtienen mejores resultados, resoluciones y unos menores tiempos de análisis.

Además de los componentes que se han citado con anterioridad, se deben de tener en cuenta también las bombas de alta presión, sistemas de inyección, desgasificadores de la fase móvil, detectores y procesamiento de datos. Los detectores que más suelen utilizar en HPLC son el UV-Vis, UV, de fluorescencia, índice de refracción diferencial, conductividad y amperométricos. Los HPLC con detectores selectivos son los que más se usan para el análisis de contaminantes orgánicos, como son los plaguicidas y los PAHs en aguas y suelo. Actualmente, al igual que en los cromatógrafos de gases, el acoplamiento con la espectrometría de masas ofrece una gran cantidad de ventajas como una mayor cantidad de analitos a determinar, reducción del tiempo de análisis y una mayor sensibilidad. La cromatografía de líquidos tiene una mayor utilidad que la de gases ya que analizan compuestos solubles en agua, eliminando la etapa de derivatización de compuestos no volátiles y termolábiles (Pérez-Fernández et al., 2017) (Robles Molina et al., 2014).

En este trabajo de fin de grado va a utilizarse en particular la cromatografía líquida de ultra resolución (UHPLC), ya que en este caso se usa medir un menor tamaño de partícula (inferior a 2 μm), obteniendo un aumento considerable en la resolución, sensibilidad y la presencia de picos más estrechos. Conjuntamente,

se obtienen menores tiempos de análisis en comparación con los del HPLC. El acoplamiento del UHPLC con la espectrometría de masas se usa para el análisis de contaminantes emergentes en diferentes muestras de agua (Robles-Molina et al., 2014).

2.4.7. Espectrometría de masas (MS).

La espectrometría de masas es una técnica que permite obtener con certeza el peso molecular de los analitos que contiene una muestra, además de su estructura. Es una herramienta muy útil para la identificación y determinación de analitos en mezclas complejas.

El fundamento de esta técnica se basa en 3 etapas: 1) **etapa de ionización**, en la que se produce una previa ionización de la muestra al pasar a través del cromatógrafo, originando una corriente o flujo de gas. 2) **Etapa de separación**, produciéndose la separación de los compuestos que con anterioridad han sido ionizados en función de su relación m/z y 3) Se realiza la **etapa de detección** según la abundancia de cada ion/analito. Todo lo que llega al detector es amplificado por un dispositivo y registrado en el hardware y software. Al final se obtiene un espectro de masas en el que se representa la intensidad frente a la relación m/z . Todo el proceso está sujeto a un elevado vacío.

Los componentes principales de un espectrómetro de masas son un sistema de introducción de la muestra, fuente de ionización, sistema de detección, analizadores de masas y procesador de datos. Cada uno de ellos se muestran en la **Figura 7**.

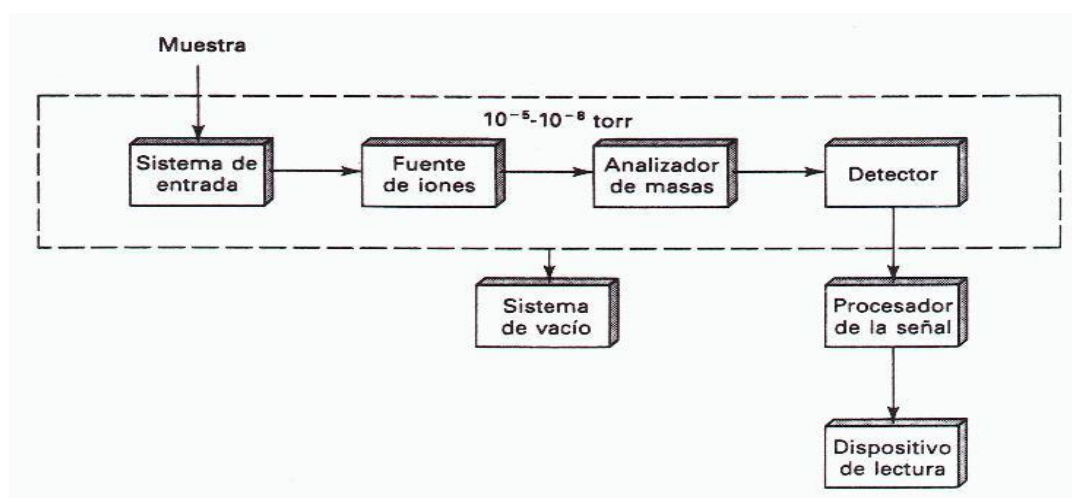


Figura 7. Constituyentes de espectrómetro de masas (Skoog et al., 2008).

El acoplamiento se genera por interfases o fuentes de ionización, va a utilizarse uno u otra dependiendo el tipo de cromatografía que vaya a realizarse, el tipo de muestra que se analice y sus propiedades, como la polaridad y el peso molecular que tengan los analitos. En el caso de la GC se utilizarán fuentes de ionización de impacto electrónico (EI) y de ionización química y para el HPLC las principales fuentes de ionización son las de presión atmosférica (API), como las de electrospray (ESI), ionización química a presión atmosférica (APCI) y fotoionización a presión atmosférica (APPI). Una adecuada ionización de los analitos es primordial para lograr un buen análisis y detección por parte del MS (Robles Molina et al., 2014).

En este trabajo de fin de grado se utilizará para el UHPLC-MS una **fente de ionización por electrospray (ESI)**, siendo está la más utilizada para este tipo de técnicas cromatográficas. Se basa en la aplicación de un fuerte campo eléctrico a presión atmosférica a un líquido que fluye a través de un capilar con un caudal bajo. El campo eléctrico induce una acumulación de carga en la superficie del líquido localizado al final de la aguja, de forma que éste se divide en pequeñas gotas cargadas. Estas gotas pasan después a través de una cortina de gas inerte (generalmente N₂) a alta temperatura para eliminar gran parte de las moléculas de disolvente y facilitando también la desolvatación. Finalmente, el proceso se completará en el interior de un capilar que guiará a los iones del analito hacia el analizador (Robles Molina et al., 2014).

La ionización se puede llevar a cabo en modo positivo o negativo. En el modo positivo, se podrán formar iones múltiplemente protonados $[M+H]^+$, En el modo negativo se observa normalmente la desprotonación de las moléculas, pudiéndose formar también iones múltiplemente desprotonados $[M-H]^-$ (Robles Molina et al., 2014). En ambos casos se produce una ionización suave, con mínima fragmentación.

Para la GC-MS/MS se utilizará una **fente de ionización de impacto electrónico**, que se basa en la llegada de la muestra a la fuente en estado gaseosa, donde las moléculas son ionizadas por bombardeo con un haz de electrones de elevada energía (Robles Molina et al., 2014).

Otro constituyente a tener en cuenta en el MS es el analizador. Los principales son los analizadores sencillos, como el cuadrupolo (Q), trampa de iones (IT), tiempo de vuelo (TOF) y orbitrap, analizadores en tándem, como en el caso del triple cuadrupolo (QqQ), MS/MS, trampa de iones (IT) y los analizadores híbridos (Robles Molina et al., 2014).

En este TFG se utilizó espectrómetro de masas en tándem MS/MS con **triple cuadrupolo** (QqQ) (**Figura 8**), por lo que en el momento que los iones se encuentran en fase gaseosa, se deben separar dependiendo de su masa, pero la propiedad que miden los analizadores es la relación masa/carga, teniendo una gran resolución. El primer cuadrupolo (Q1) actúa como un filtro que selecciona y separa las moléculas cargadas del resto de componentes que eluyen del cromatógrafo. El proceso de disociación que ocurre en el Q2, es inducido por un gas ionizado y acelerado, de forma que colisiona con las moléculas de analito provocando su fragmentación. El tercer cuadrupolo (Q3) actúa también como filtro, pero en este caso de los fragmentos producidos por disociación que llegan del segundo cuadrupolo (Q2), dejando pasar hacia el detector solo aquellas masas del fragmento seleccionados (Robles Molina et al., 2014) (Robles Molina et al., 2014b).

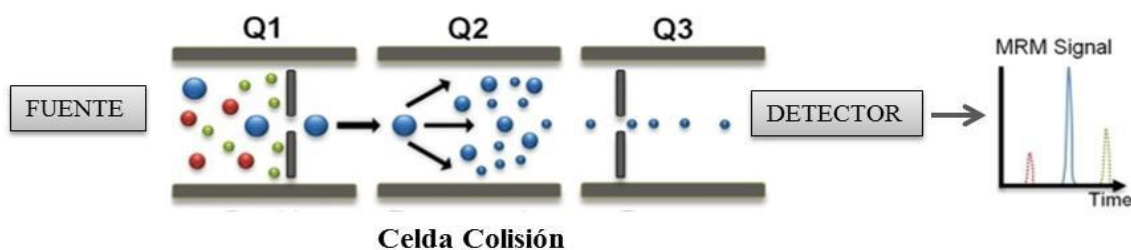


Figura 8. Esquema de un QqQ- MS (Herrera-Sonia et al., 2015).

Estos instrumentos son robustos, de relativo bajo coste, fáciles de operar y son muy selectivos, por lo que solventa de mejor forma el efecto matriz. Además, permiten monitorizar un gran número de transiciones ion precursor → ion fragmento en un único análisis. Sin embargo, la velocidad de escaneo limita el número de transiciones que se pueden monitorizar simultáneamente con sensibilidad y precisión adecuadas (Robles Molina et al., 2014).

Este acoplamiento que puede verse en la **Figura 9** induce una serie de ventajas para ser la de referencia para el análisis de contaminantes en matrices son que es una técnica cualitativa, cuantitativa, con una gran sensibilidad, universal y específico, además puede analizar mezclas complejas proporcionando información estructural y de manera rápida, permitiendo una identificación precisa y cuantificación de contaminantes incluso en matrices muy complejas como la superficie o aguas residuales (Rodriguez-Narvaez et al., 2017).

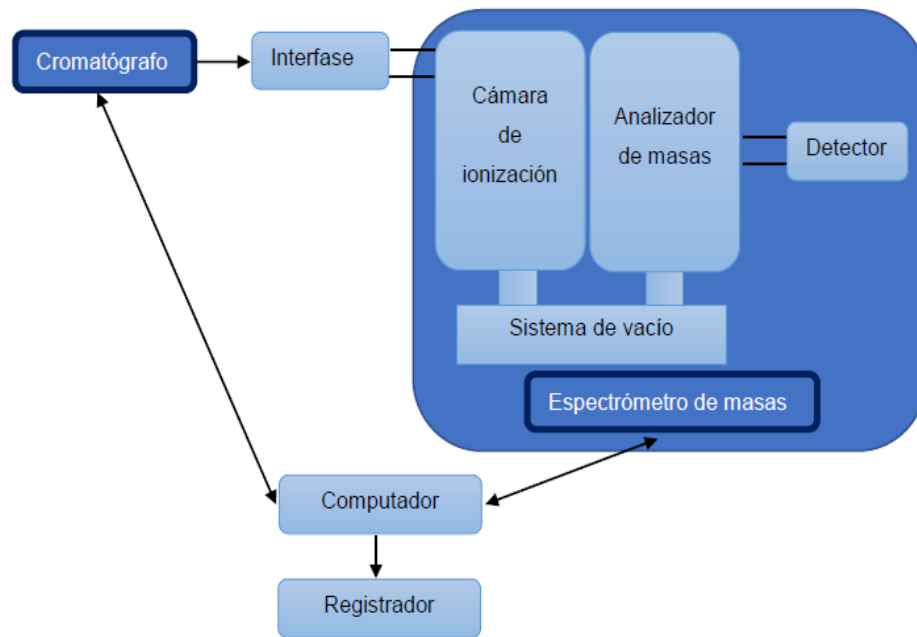


Figura 9. Esquema de acoplamiento de una cromatografía de líquidos/gases / espectrometría de masas.

3. OBJETIVOS.

La finalidad de este trabajo de fin de grado es la determinación y cuantificación de ciertos contaminantes orgánicos (prioritarios o emergentes) hallados en las muestras de aguas superficiales. La mayoría de ellos están regulados, pero otros no están incluidos en la última decisión de contaminantes prioritarios de 2013/397CE (Comisión Europea, 2013) ni en la de seguimiento de 2015/495/CE (Comisión Europea, 2015).

Los objetivos prioritarios de este trabajo son estudiar el nivel de contaminantes orgánicos (prioritarios o emergentes) en las muestras de agua superficiales mediante la UHPLC-MS/MS ESI y la GC-MS/MS EI, ambas con un analizador de triple cuadrupolo (QqQ), además de estimar la calidad de las diferentes muestras de aguas, teniendo en cuenta las normativas vigentes para evaluar los resultados obtenidos.

4. PARTE EXPERIMENTAL.

4.1. Reactivos y materiales empleados.

Los reactivos y materiales que han sido utilizados en cada uno de los procesos aparecen en la **tabla 6**.

Tabla 6. Reactivos y materiales utilizados.

SPE + LC-MS/MS		LLE+ GC-MS/MS
-Acetonitrilo	CHROMASOLV	-Acetato de etilo >99,8 %, Pestanal,
Honeywell >99,9%.		Fluka analytical.
- Agua para cromatografía, Lichrosolv.		- Agua ultrapura, MiliQ.
- Agua ultrapura, MiliQ.		- Cloruro sódico >99,5 %, Sigma
- Cartuchos Agilent Bond elut PLEXA,		Aldrich.
200 MG 6 cc 30 /PK.		- Embudos de decantación de 250
- Evaporador TurboVap LV.		ml.
- Metanol >99,9%, Honeywell.		- Hexano de pureza cromatográfica
- Micropipetas 1 – 5 mL y 1 – 10 mL.		>97 %, Sigma Aldrich.
- Montaje SPE (Soporte y pinzas).		

- Muestras de agua superficial. - Probeta de 200 mL. - Tubos de ensayo. - Vasos de precipitado de 100 y 250 mL. - Viales de 2 mL. - Vortex.	- Matraces de fondo redondo de 100 y 250 ml. -Montaje de embudos de decantación (soporte y aro metálico) - Muestras de agua superficial. - Pipetas Pasteur de vidrio. - Probetas de 50 y 100 ml. - Rotavapor BUCHI R-200. - Sulfato de sodio anhidro 99 – 100,5 %, Panreac. - Baño de Ultrasonidos. - Vasos de precipitado de 250 ml. - Viales de 2 ml.
--	--

4.2. Muestreo y conservación de muestra.

La importancia de prestar una especial atención a las técnicas de muestreo es por la repercusión que tienen sobre la precisión, exactitud y representatividad de los datos que resulten de los análisis y, sobre todo en la reproducibilidad del proceso completo. En muchas ocasiones, no se le presta la atención suficiente y se introducen errores que no son subsanables posteriormente (Herrera-Sonia et al., 2015).

Deben de recogerse muestras de diferentes puntos de la región de estudio para así garantizar su representatividad, por lo que se recogieron de forma manual, 5 litros de agua de cada uno de los pantanos Giribaile (**Figura 10**), Rumblar (**Figura 11**) el día 30 de abril y 2 litros de cada una de las lagunas de Garciez y Honda el 19 de abril, en botellas de vidrio de color ámbar, ya que las paredes de los recipientes de plástico pueden resultar porosas para algunos contaminantes orgánicos volátiles. Antes de que se recolectaran cada una de las botellas, se enjuagaron con agua de muestra, debiendo de llenarse completamente el envase, para evitar la pérdida de contaminantes orgánicos volátiles en los espacios vacíos. Recogiéndose un total de 14 muestras y después fueron

trasladadas al laboratorio, conservándose en frigoríficos a 4 °C (Pascual Aguilar et al., 2017).



Figura 10. Pantano del Giribaile.

Figura 11. Pantano del Rumblar.

Cuando la muestra se encuentre en el laboratorio será sometida a una etapa de tratamiento en el que se eliminan interferentes y se preconcentran analitos. Y una etapa de determinación para identificar y determinar los contaminantes orgánicos de interés.

4.3. Determinación de contaminantes orgánicos mediante una extracción en fase sólida (SPE) y análisis por cromatografía de líquidos/espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS).

4.3.1. Extracción en fase sólida.

Para realizar la SPE (**Figura 12**) se han utilizado cartuchos Agilent Bond Elut PLEXA (200 mg, 6 ml). El proceso de extracción (Robles-Molina et al., 2014) y tratamiento de muestra ha sido dividido en 3 etapas:

- 1) Acondicionamiento. Se añaden 4 ml de metanol por duplicado, con un caudal de 4 ml/min, para lavar el cartucho. Seguidamente, con el propósito de equilibrar el cartucho a la composición necesaria para la muestra se añaden por duplicado 4 ml de agua MiliQ con un caudal de 4 ml/min.
- 2) Carga de muestra. Con ayuda de una probeta se cogen 200 ml de muestra y se transvasa a un vaso de precipitado de 250 ml. Se pasan los 200 ml por el cartucho en porciones de 3 ml a un caudal de 3 ml/min. Por último, se debe de

pasar aire en varias ocasiones a través del cartucho para eliminar el agua que quede.

3) Elución. Para eluir los analitos de interés, se añaden 4 ml de metanol, este proceso se hace por duplicado, a un caudal de 1 ml/min.



Figura 12. Montaje extracción en fase sólida.

Una vez que se ha finalizado la extracción en fase sólida, se procede a realizar la eliminación del metanol (disolvente) con un evaporador TurboVap LV (**Figura 13**), agitando antes las muestras con ayuda de un vortex. Las condiciones a las que las muestras fueron sometidas en el evaporador son las siguientes: una presión de nitrógeno alrededor de 20 psi y un baño a unos 40 °C. Los tiempos de evaporación se encontraban entre los 30 y 40 minutos. Por último, el residuo fue reconstituido con 4 ml de una mezcla de agua:metanol (80:20). De la disolución se cogen 2 ml y se transvasan a viales de 2 mL para su subsiguiente análisis por LC – MS/MS.



Figura 13. Evaporador TurboVap LV.

4.3.2. Cromatografía de líquidos / espectrometría de masas en tándem (LC – MS/MS).



Figura 14. Cromatografía de líquidos/espectrometría de masas en tándem con un analizador triple cuadrupolo.

El equipo que se ha utilizado para realizar la separación, identificación y determinación de analitos ha sido el cromatógrafo de líquidos de ultra-elevada eficacia, UHPL Dionex Ultimate 3000 (**Figura 14**) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE. UU) acoplado a un espectrómetro de masas con un detector de triple cuadrupolo, TSQ Quantiva Triple Quadrupole Mass Spectrometer (Thermo Fisher Scientific, San José, California, EE.UU). Este acoplamiento se realiza mediante una fuente de ionización por electrospray (ESI)

en modo positivo. Las condiciones usadas durante los análisis y los parámetros de ionización del espectrómetro de masas se muestran en la **tabla 7**.

Tabla 7. Parámetros y condiciones del espectrómetro de masas.

Parámetro	Valor utilizado
Voltaje del capilar	3600 V
Sheath Gas	45 unidades arbitrarias.
Auxiliar Gas	10 unidades arbitrarias
Sweep Gas	0 unidades arbitrarias
T ^a Transfer Tube	325 °C
T ^a de Vaporización	350 °C
CID Gas	1,5 mTorr
Fragmentación en fuente	0 V
Resolución Q ₁ y Q ₃	0.7 FWHM

Se usó una columna de fase reversa Zorbax Eclipse Plus C₁₈ RRHD (Rapid Resolution HD) 2,1 x 50 mm, 1,8 µm de tamaño de partícula (Agilent Technologies, Santa Clara, California, EE. UU). En el proceso de análisis, la temperatura de la columna fue de 30 °C. La elución de cada uno de los analitos se llevó a cabo en gradiente con un tiempo de análisis de 23 minutos por cada muestra (**tabla 8**). Las fases móviles que se usaron fueron una con 100 ml de agua y otra de 100 ml de acetonitrilo, ambas con un 1% de ácido fórmico (100µl).

El flujo de las fases móviles fue constante en todo momento, a 0,3 ml / min. La inyección de cada una de las muestras se lleva a cabo mediante un sistema automatizado y el volumen de inyección es de 5 µl.

Tabla 8. Gradiente de elución.

Tiempo (min)	%B
0	5
0	5
0.7	5

7	70
10	95
12	95
15	5
23	5

El calibrado fue en agua:acetonitrilo (80:20) a las concentraciones de 50, 10, 5, 1, 0,5, 0,1, 0,01, 0,001 µg/L y los blancos contenían una mezcla de agua metanol (80:20).

La identificación de cada uno de los pesticidas, se llevó a cabo utilizando el programa Thermo TraceFinder, que permite realizar una búsqueda automatizada de las masas precisas de cada uno de los iones característicos de un contaminante con una tolerancia de $\pm 0,1$ min.

Los pesticidas que han sido estudiados por el método LC-MS/MS se encuentran en la **tabla 9**, de los que se han encontrado 9 resultados positivos.

Tabla 9. Listado de pesticidas estudiados por el método LC-MS/MS.

Pesticidas estudiados	Tiempo de retención (RT)	Masa ion precursor (m/z)	Masa fragmento de cuantificación (m/z)	Energía de colisión (V)	Masa fragmento de confirmación (m/z)
1. Acefato.	1,29	184,1	143	10,3	124,8
2. Acetamiprid.	3,77	223,1	126	21,8	90
3. Alacloro.	6,96	270,1	238,1	10,3	162,1
4. Atracina.	5,76	216,1	174,1	17,9	104
5. Azoxistrobina.	6,48	404,1	372,1	14,6	344,1
6. Benalaxil.	7,33	326,1	148,1	20,5	293,9
7. Bitertanol.	6,8	338,1	269,2	10,3	69,9
8. Boscalid.	6,55	343	307	19,9	271,1
9. Bromuconazol A.	6,29	377,9	159	30,5	160,9
10. Bromuconazol B.	6,57	377,9	159	29,8	160,9
11. Bupirimate.	5,77	317,1	166,1	24,7	210,1
12. Buprofezin.	7,02	306,1	201	12,2	106,1
13. Carbaryl.	5,24	202,1	145,1	10,3	127
14. Carbendazim.	2,29	192	160	19,1	131,9

15. Carbofuran.	5,03	222,1	165,1	11,8	123
16. Carfentrazona-etilo.	7,31	412	346	23,6	366
17. Chlorfenvinphos A.	6,76	358,9	170	12,7	155,1
18. Chlorfenvinphos B.	7,18	358,9	155,1	12,7	170
19. Clorotoluron.	5,14	213,2	72	18,9	140
20. Clorpirifos.	8,7	350	197,9	20,8	321,9
21. Cyanazine.	4,68	241,1	214,1	17,3	104
22. Dazomet.	2,75	163,2	89,9	10,3	119,9
23. Diazinon.	7,59	305	169,1	21,5	153,1
24. Dicrotofos.	2,93	238,1	112	13	127
25. Difenconazol.	7,29	406,2	251	25,8	337
26. Diflufenican.	7,95	395,2	266,4	23,3	246,3
27. Dimetoato.	3,66	230,1	199	10,3	125
28. Dimethomorph A.	5,86	388,2	301,1	19,2	165,1
29. Dimethomorph B.	5,97	388,2	301,1	19,2	165,1
30. Diniconazol.	6,96	326,1	70	26,3	159
31. Diuron.	5,42	233,2	72	18,4	160
32. Dodine.	5,93	228,2	57	24,1	186,2
33. Etion.	8,8	385	199	10,3	143
34. Etofenprox + NH ₄ .	10	394,3	177	14,3	359,2
35. Fenamifos.	6,35	304,2	217	23	201,9
36. Fenamifos-sulfona.	4,88	336,2	266,2	18	308
37. Fenarimol.	6,26	331,1	268,1	22,9	189
38. Fenazaquin.	8,54	307,1	161,2	17,8	147,1
39. Fenhexamid.	6,54	302	97,1	23,2	143
40. Fenitrothion.	7,49	278	125	19,8	109,1
41. Fenitrothion sin fragmentos.	2,3	295,2	254,1	10,3	212,9
42. Fenpropimorfo.	5,24	304,3	147,1	23,1	117,1
43. Fenti3n.	7,49	279	247	18,7	169

44. Fentión sulfóxido.	4,99	295	280	19,1	108,9
45. Fluquinconazol.	6,61	376	349	15,5	307
46. Flutriafol.	5,22	302,1	69,9	19,7	123
47. Haloxyfop.	6,85	362	316	17,6	288
48. Imazalil.	4,62	297,1	159	24,2	255,1
49. Imazalil metabolito.	3,4	257	69	22,4	125
50. Isocarbofos.	6,12	230,6	121	15,3	137
51. Isoproturon.	5,37	207,2	72	18,4	165,1
52. Kresoxim-metil.	7,33	314	267,1	10,3	222,1
53. Linuron.	6,24	249	159,9	13,1	182
54. Malaoxon.	4,94	315,2	99	22,7	143
55. Malathion A.	6,92	331,1	99,1	21,3	127,1
56. Malatión B.	7,76	331,1	127,1	21,3	99,1
57. Mepanipirima.	6,65	224,2	77	34,6	106,1
58. Metalaxil.	5,38	280,2	220,1	13,3	160,1
59. Metamidofos.	0,91	142	94	14,3	110
60. Methiocarb.	6,13	226	169	10,3	121,1
61. Metomilo.	2,67	163,1	88	10,3	106
62. Monocrotofos.	2,7	224,1	127	16,2	193
63. Norflurazon.	5,57	304,1	284	23,5	160,1
64. Ometoato.	1,79	214	125	23	183
65. Paclobutrazol.	5,97	294,1	70	21,4	125
66. Penconazol.	6,76	284,1	159	30,3	69,9
67. Penciacuron.	7,76	329,1	125	26	218,1
68. Phosmet.	6,42	318,1	160,1	17,8	133,1
69. Pirimifos metil	7,48	306,2	164,1	22,2	108
70. Procloraz.	5,93	376	307,9	12	265,9
71. Procloraz metabolito.	4,2	282,1	86	17,6	58,1
72. Profenofos.	7,99	374,9	304,8	18,5	346,9
73. Propaquizafop.	8,22	444,2	371	10,3	299,1
74. Propiconazol.	6,97	342	159	29,8	173

75. Pymetrozine A.	0,52	218,2	105	20,5	79
76. Pymetrozine B.	1,2	218,2	105	20,5	79
77. Pirimetanil.	4,7	200,1	107	24,9	82
78. Piriproxifeno.	8,52	322,2	96	15,8	185,2
79. Quimerac.	3,45	222	204	16	141,1
80. Quinalfos.	7,33	299,2	163	18,8	147
81. Quinoxifen.	7,95	308	196,9	32,9	162
82. Quizalofop-etil.	8,11	373,2	299	18,6	271,1
83. Rotenone.	7	395,1	213	23,2	192,1
84. Spinosyn A.	5,96	732,4	142,1	28	98,1
85. Spinosyn D.	6,22	746,5	142,1	28	98,1
86. Tebuconazol A.	5,93	308,1	69,9	23	125
87. Tebuconazol B.	6,6	308,1	69,9	23	125
88. Tebufenpyrad.	8,12	334,1	116,9	34,9	145,1
89. Terbutilazina.	6,12	230,2	174,1	17,2	132
90. Terbutilazina-desetilo.	4,68	202,1	146,196	16,4	104
91. Tetraconazol.	6,58	372,1	159	32,7	123
92. P Tiabendazol.	2,5	202,2	175,1	25	131,1
93. Thiacloprid.	4,24	253	126	21,3	186
94. Tiametoxam.	3,06	292	211,1	10,3	181
95. Tiofanato de metilo.	4,88	343	151	20,9	311
96. Triadimenol.	5,96	296,1	69,9	10,3	42,8
97. Triazofos.	6,94	314,1	162,1	18,7	119
98. Triclorfón.	3,22	256,9	108,9	17,8	221
99. Zoxamida A.	4,88	336,1	187	22,8	159
100. Zoxamida B.	7,59	336,1	187	22,8	159

A modo de ejemplo de entre los 100 pesticidas, se incluye un cromatograma (**Figura 15**) y un espectro de masas (**Figura 16**) del clorotoluron, debido a que es uno de los pesticidas que se ha detectado en un mayor número de muestras.

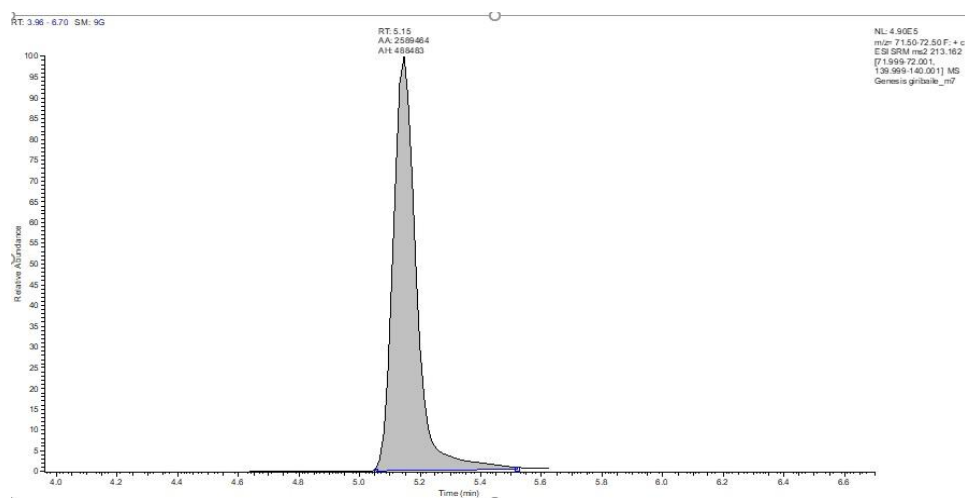


Figura 15. Cromatograma del clorotoluron de la muestra de Giribaile.

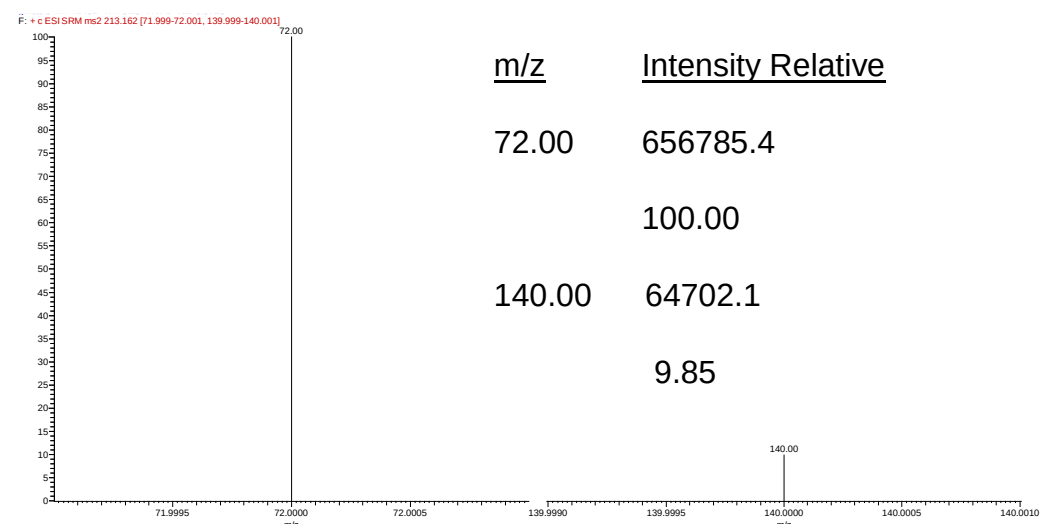


Figura 16. Espectro de masas del clorotoluron de la muestra de Giribaile.

4.4. Determinación de contaminantes orgánicos mediante extracción líquido-líquido (LLE) y análisis mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas en tándem (GC-MS/MS).

4.4.1. Extracción líquido-líquido.

Se mide con una probeta 100 ml de la muestra. Este volumen de agua se trasvasará a un embudo de decantación (**Figura 17**). Se añade aproximadamente 0,25 g de cloruro sódico, pesados en una balanza analítica, con el objetivo de saturar las fases y mejorar la extracción para que no se formen emulsiones. Seguidamente, se realizará la extracción con hexano añadiendo 25

ml al embudo de decantación. A continuación, se agita enérgicamente durante 3 minutos y se dejan decantar cada una de las fases. Se recoge la fase orgánica (superior) que se irá dejando en un matraz de fondo redondo y la fase acuosa se vuelve a introducir en el embudo para realizar el mismo proceso 2 veces más.



Figura 17. Montaje embudos de decantación (soporte y aro metálico).

Una vez que se han realizado las 3 extracciones, el extracto obtenido se llevará a un rotavapor BUCHI R-200 (**Figura 18**) para eliminar el hexano (disolvente). En algunas muestras ha sido necesario añadirle sulfato de sodio anhidro para eliminar parte de fase acuosa que había en el extracto. El residuo obtenido una vez que se ha eliminado el hexano se reconstituye en 1 ml de acetato de etilo. Después, se lleva a un baño de ultrasonidos con el objetivo de disolver el residuo en la mezcla. Para finalizar, se trasvasará a viales de 2 mL con ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio y se realizará el análisis por GC – MS/MS.

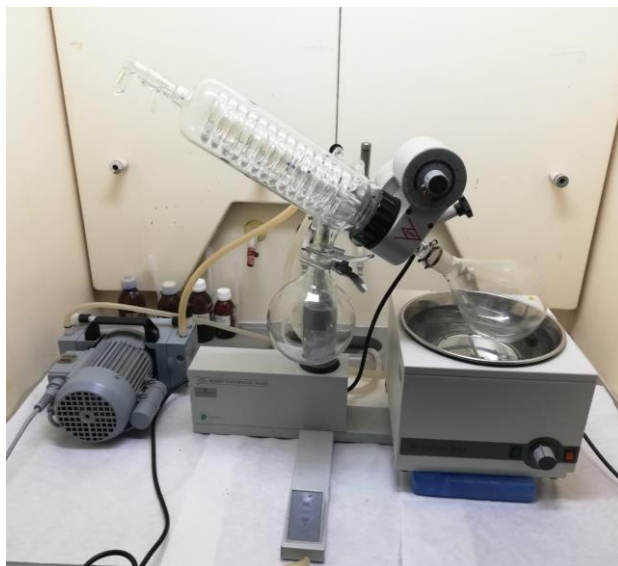


Figura 18. Montaje completo del rotavapor.

Para las muestras que han sido obtenidas en Garciez y Honda, ha sido necesario añadir una mayor cantidad de cloruro sódico, unos 0,5 g, debido a la gran cantidad de emulsiones que se formaban. Llevando a cabo el mismo procedimiento citado anteriormente, pero dejando decantar durante unos 10 o 15 minutos realizando cada cierto tiempo una agitación orbital.

4.4.2. Cromatografía de gases / espectrometría de masas en tándem (GC – MS/MS).

El método que se ha seguido se encuentra descrito por Hakme et al., 2018. Se usó un sistema Agilent Intuvo 9000 GC equipado con un inyector automático Agilent 7693 y un analizador de triple cuadrupolo Agilent 7010 GC-MS / MS como detector. Las muestras se inyectaron utilizando un inyector con programador de temperatura PTV en modo splitless, usando liner y una frita de lana de vidrio. El volumen de inyección fue de 1 μ L. Se usó una columna Agilent, HP-5MS, de 15 m de largo $\times$ 0.25 mm i.d. y 0,25 μ m de espesor de película.

El programa de temperatura del horno de la columna fue el siguiente: 60 ° C durante 0,5 min, hasta 170 ° C a 80 ° C min⁻¹ y finalmente hasta 310 ° C a 20 ° C min⁻¹. El tiempo total de análisis fue de 13,4 minutos. Se utilizó helio (99,999% de pureza) como portador (1,1 ml / min) y gas de enfriamiento, y nitrógeno (99,999% de pureza) como gas de colisión. Los flujos de gases de colisión y enfriamiento fueron 1.5 mL / min y 2.25 mL / min, respectivamente. Tanto la línea de transferencia como la fuente de iones, operada en modo de ionización por

impacto electrónico, se mantuvieron a 280 ° C. La temperatura del analizador de cuadrupolo se fijó a 150 ° C. Se ha inyectado una curva de calibración preparada en disolvente e incluyendo 203 estándares de pesticidas en cinco niveles de calibración (0,1, 1, 5, 10 y 100, µg/L)

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Las concentraciones de los 9 pesticidas polares determinados y cuantificados en el LC-MS/MS fueron calculados mediante la interpolación del área en la recta de calibrado para cada uno de los contaminantes. Teniendo en cuenta también el factor de preconcentración (100:1) en cada una de las concentraciones, encontrándose en la **tabla 10** la media de los resultados obtenidos de cada pesticida para cada uno de los pantanos o lagunas.

Tabla 10. Concentración de pesticidas en las aguas superficiales de pantanos y lagunas en µg/L.

Pesticidas	Rumblar ([] media µg/L)	Giribaile ([] media µg/L)	Garciez ([] media µg/L)	Honda ([] media µg/L)
1. Azoxistrobina.	-	-	-	0,001
2. Carbendazim.	-	0,007	-	-
3. Clorotoluron.	-	0,081	0,023	1,12
4. Diflufenican.	-	0,040	-	-
5. Dimetoato.	0,001	0,051	-	-
6. Imidazil metabolito.	-	0,001	-	-
7. Tebuconazol B.	-	0,014	-	0,005
8. Terbutilazina.	-	0,003	-	0,001
9. Terbutilazina desetilo.	-	0,005	-	0,004
Total (µg/L)	0,001	0,202	0.203	1,127

Las concentraciones a las que deben de encontrarse estos compuestos son muy bajas (ng/L). El Real Decreto **RD/140/2003** (Comisión Europea, 2003) establece unos límites acerca de la calidad del agua destinada al consumo, siendo el valor máximo que se permite de 0,1 µg/L para 1 sólo pesticida y para un conjunto de ellos de 0,5 µg/L. Si se observan los datos que aparecen en la **tabla 10**, se puede

afirmar que los pesticidas polares que han sido determinados en las muestras se encuentran muy por debajo del límite establecido, excepto el clorotoluron que se encuentra en unas concentraciones muy superiores (1,12 µg/L) en la laguna de Honda, en la que, si se observa la suma total de las concentraciones de los pesticidas encontrados en los pantanos y lagunas, puede verse que en este caso también lo supera.

Los resultados que se han obtenido demuestran una elevada eficacia por parte de los métodos basados en el acoplamiento de cromatografía de líquidos de ultra elevada eficacia/espectrometría de masas en tándem, para la detección de contaminantes emergentes a muy bajas concentraciones, siendo una de las razones por lo que son lo más utilizados actualmente.

En el caso de los pesticidas determinados en la GC-MS/MS, se pudieron identificar y cuantificar 5 de ellos. Teniendo en cuenta también el factor de preconcentración (100:1) en cada una de las concentraciones, encontrándose en la **Tabla 11** la media de los resultados obtenidos de cada contaminante para cada uno de los pantanos o lagunas.

Tabla 11. Concentración de contaminantes en las aguas superficiales de pantanos y lagunas en µg/L.

Contaminantes	Rumblar ([] media µg/L)	Giribaile ([] media µg/L)	Garciez ([] media µg/L)	Honda ([] media µg/L)
1. Alacloro.	-	0,183	-	0,227
2. 4,4'- Diclorobenzofenona.	-	-	-	0,036
3. α-endosulfán.	0,016	-	-	-
4. HCB.	0,007	-	-	-
5. Fosfato de trifenilo	-	-	-	0,063
Total (µg/L)	0,023	0,183		0,326

Si se observan los datos que aparecen en la **tabla 11**, se puede afirmar que 3 pesticidas y el fosfato de trifenilo (plastificante y retardante de llama) se encuentran muy por debajo del límite establecido. Teniendo en especial

consideración el alacloro, debido a que se trata de un contaminante prioritario regulado por la **Directiva 2013/39/CE** (Comisión Europea, 2013). Su concentración máxima admisible en aguas superficiales es de 0,7 µg/L, encontrándose en el pantano del Giribaile y en la laguna Honda por debajo del valor de concentración admisible. Además, si se observa la suma total de las concentraciones de los pesticidas encontrados en los pantanos y lagunas, puede verse que en todos los casos es inferior al límite máximo establecido.

6. BIBLIOGRAFÍA.

Baek S.O., Field R.A., Goldstone M.E., Kirk P.W., Lester J.N., Perry R. (1991). A review of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: sources, fate and behavior. *Water, Air, Soil Pollut.* 60, 279-300.

Ballesteros-Gómez, A., Rubio, S., & Pérez-bendito, D. (2008). Determination of priority carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in wastewater and surface water by coacervative extraction and liquid chromatography – fluorimetry. *Journal of Chromatography A*, 1203, 168-176.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.07.044>

Barbosa, M. O., Moreira, N. F. F., Ribeiro, A. R., Pereira, M. F. R., & Silva, A. M. T. (2016). Occurrence and removal of organic micropollutants: An overview of the watch list of EU Decision 2015/495. *Water Research*, 94, 257–279.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.02.047>

BOE, 2003. Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano.

Comisión Europea, 2000. Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de Octubre de 2000 por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas.

Comisión Europea, 2008. Directiva 2008/105/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas, por la que se modifican y derogan ulteriormente las Directivas 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE y 86/280/CEE del Consejo, y por la que se modifica la Directiva 2000/60/CE.

Comisión Europea, 2013. Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 12 de agosto de 2013, por la que se modifican las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE en cuanto a las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas

Decisión N° 2455/2001/CE del Parlamento Europeo y Del Consejo de 20 de noviembre de 2001 por la que se aprueba la lista de sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas, y por la que se modifica la Directiva 2000/60/CE. L331, 15.12.2001, 1-5.

Dimpe, K. M., & Nomngongo, P. N. (2016). Current sample preparation methodologies for analysis of emerging pollutants in different environmental matrices. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 82, 199–207. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.05.023>

Gilbert, J. C., Martin, S. F. *Experimental Organic Chemistry*, 5th Ed. Cengage Learning: Boston, MA, 2011.

Gogoi, A., Mazumder, P., Tyagi, V. K., Tushara Chaminda, G. G., An, A. K., & Kumar, M. (2018). Occurrence and fate of emerging contaminants in water environment: A review. *Groundwater for Sustainable Development*, 6, 169–180. <https://doi.org/10.1016/j.gsd.2017.12.009>

Gonzalez, S., & Petrovic, M. (2003). Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. 22, 685–696. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)01105-1](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)01105-1)

Hakme, E., Lozano, A., Uclés, S., & Fernández-alba, A. R. (2018). Further improvements in pesticide residue analysis in food by applying gas chromatography triple quadrupole mass spectrometry (GC-QqQ-MS / MS) technologies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* , 410, 5491-5506. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0723-x>

Hernández Hernández, L., González Pérez, C. *Introducción al análisis instrumental*, primera edición. Ariel, Barcelona, 2002.

Robles Molina, J. (2014). Desarrollo de metodologías analíticas mediante cromatografía/espectrometría de masas para el control de contaminantes

orgánicos prioritarios y emergentes en aguas residuales y superficiales, Universidad de Jaén, Tesis Doctoral.

Kuzmanović, M., Ginebreda, A., Petrović, M., & Barceló, D. (2015). Risk assessment based prioritization of 200 organic micropollutants in 4 Iberian rivers. *Science of the Total Environment*, 503–504, 289–299. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.06.056>

Bartolomé Jimeno, M. (2015). Análisis de contaminantes orgánicos en muestras biológicas humanas con técnicas cromatográficas, Universidad Nacional De Educación A Distancia (UNED), Madrid, Tesis Doctoral.

Pascual Aguilar, J. A., Andreu, V., Campo, J., Picó, Y., & Masiá, A. (2017). Pesticide occurrence in the waters of Júcar River, Spain from different farming landscapes. *Science of the Total Environment*, 607–608, 752–760. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.176>

Pérez-Fernández, V., Mainero Rocca, L., Tomai, P., Fanali, S., & Gentili, A. (2017). Recent advancements and future trends in environmental analysis: Sample preparation, liquid chromatography and mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 983, 9–41. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.06.029>

Petrovic, M., Farré, M., de Alda, M. L., Perez, S., Postigo, C., Köck, M., Radjenovic, J., Gros, M., & Barcelo, D. (2010). Recent trends in the liquid chromatography-mass spectrometry analysis of organic contaminants in environmental samples. *Journal of Chromatography A*, 1217, 4004–4017. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.02.059>

Pico, Y., Belenguer, V., Corcellas, C., Diaz-Cruz, M. S., Eljarrat, E., Farré, M., Gago-Ferrero, P., Huerta, B., Navarro-Ortega, A., Petrovic, M., Rodríguez-Mozaz, S., Sabater, L., Santín, G., & Barcelo, D. (2019). Contaminants of emerging concern in freshwater fish from four Spanish Rivers. *Science of the Total Environment*, 659, 1186–1198. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.366>

Real Decreto 817/2015, de 11 de septiembre, por el que se establecen los criterios de seguimiento y evaluación del estado de las aguas superficiales y las normas de calidad ambiental. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio

Ambiente. Boletín Oficial del Estado, 12 de septiembre de 2015, nº 219, 80582-80677.

Robles-Molina, J., Gilbert-López, B., García-Reyes, J. F., & Molina-Díaz, A. (2013). Gas chromatography triple quadrupole mass spectrometry method for monitoring multiclass organic pollutants in Spanish sewage treatment plants effluents. *Talanta*, 111, 196–205. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.03.006>

Robles-Molina, J., Gilbert-López, B., García-Reyes, J. F., & Molina-Díaz, A. (2014). Monitoring of selected priority and emerging contaminants in the Guadalquivir River and other related surface waters in the province of Jaén, South East Spain. *Science of the Total Environment*, 479–480, 247–257. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.01.121>

Rodriguez-Narvaez, O. M., Peralta-Hernandez, J. M., Goonetilleke, A., & Bandala, E. R. (2017). Treatment technologies for emerging contaminants in water: A review. *Chemical Engineering Journal*, 323, 361–380. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.04.106>

Skoog, D.A., Holler, F.J., Crouch, S.R. Principios de análisis instrumental, 6ª edición. Cengage Learning, México D.F., 2008.

Herrera López, S. (2015). Aplicación de técnicas avanzadas de espectrometría de masas acoplada a cromatografía y de gases bidimensional para la evaluación de los contaminantes emergentes en productos de degradación del medio ambiente, Universidad de Almería, Tesis Doctoral.

Sousa, J. C. G., Ribeiro, A. R., Barbosa, M. O., Pereira, M. F. R., & Silva, A. M. T. (2018). A review on environmental monitoring of water organic pollutants identified by EU guidelines. *Journal of Hazardous Materials*, 344, 146–162. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.09.058>